

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



Evaluación de la actividad de flavonoides y sus metabolitos
en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

Felipe Artemio Surco Laos

Salamanca 2011



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA

Campus Miguel de Unamuno-37007 Salamanca
Teléf.: 923 294537 – Fax: 923 294515
e-mail: nut@usal.es

Celestino Santos Buelga, Catedrático de Nutrición y Bromatología y Montserrat Dueñas Patón, Investigadora Ramón y Cajal de la Universidad de Salamanca, directores del trabajo "*Evaluación de la actividad de flavanoides y sus metabolitos en el organismo modelo Caenorhabditis elegans*", realizado por **Felipe Artemio Surco Laos** para optar al título de Doctor, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 29 de agosto de 2011

Celestino Santos Buelga

Montserrat Dueñas Patón

El trabajo expuesto en la presente memoria ha dado lugar hasta la fecha a las siguientes publicaciones científicas y participaciones en congresos tanto internacionales como nacionales:

Publicaciones:

- Felipe Surco-Laos, Juan Cabello, Eva Gómez-Orte, Susana González-Manzano, Ana M. González-Paramás, Celestino Santos-Buelga, Montserrat Dueñas. Effects of *O*-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function* **2011**, 2, 445-456.
- Felipe Surco-Laos, Montserrat Dueñas, Susana González-Manzano, Juan Cabello, Celestino Santos-Buelga, Ana M. González-Paramás. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Research International*. Enviado para su publicación, en periodo de revisión.
- Felipe Surco-Laos, Juan Cabello, Susana González-Manzano, Ana M. González-Paramás, Celestino Santos-Buelga, Montserrat Dueñas. Comparison of the effects and availability of quercetin and quercetin 3-*O*-glucoside on *Caenorhabditis elegans*. En preparación.

Participación en congresos:

- Dueñas M., Surco-Laos F., González-Paramás AM., Cabello J., Santos-Buelga C. Effects on lifespan and bioavailability of quercetin on *Caenorhabditis elegans*. 4th International Conference on polyphenols and health, **2009**, Harrogate (Reino Unido). Poster.
- Surco-Laos F., Dueñas, M., Gonzalez-Manzano, S., González-Paramás A., Cabello, J., Santos-Buelga, C. Effect of quercetina-3-*O*-glucoside on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. 3rd Spanish Worm Meeting, **2011**, Logroño (España). Oral.
- Dueñas, M., Surco-Laos F., Gonzalez-Manzano, S., González-Paramás A., Delgado, L., Gómez-Orte, E., Cabello, J., Santos-Buelga, C. Comparison of the effects and availability of quercetin and quercetin-3-*O*-glucopyranoside on *Caenorhabditis elegans*. 5th International Conference on polyphenols and health, **2011**, Sitges (España). Poster.

- Surco-Laos F., Dueñas, M., Gonzalez-Manzano, S., González-Paramás A., Delgado, L., Gómez-Orte, E., Cabello, J., Santos-Buelga, C. Activity and bioavailability of quercetin, catechins and their *O*-methylated metabolites on *Caenorhabditis elegans*. 5th International Conference on polyphenols and health, **2011**, Sitges (España). Oral.

Para la realización de este trabajo se ha contado con los siguientes apoyos institucionales:

Beca de Tercer Ciclo y Doctorado del Grupo Santander Central Hispano- Universidad de Salamanca. (Periodo 2007-2010).

Proyectos de Investigación del Ministerio de Ciencia e innovación AGL2009-12001 y CSD2007-00063 (Programa Consolider-Ingenio 2010).

Ayuda asociada al Contrato del Programa “Ramón y Cajal” de la Dra. Montserrat Dueñas Patón.

Al final de esta etapa quiero dar las gracias a todas y cada una de las personas que durante todo este tiempo me han apoyado en lo profesional y lo personal contribuyendo a que este trabajo vea la luz. Mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de ellas.

Al Dr. Celestino Santos Buelga director de este trabajo por permitirme la posibilidad de trabajar en este departamento e integrar su equipo de investigación. Por confiar en mí, por su interés y apoyo.

A la Dra. Montserrat Dueñas Patón, directora de esta tesis, por toda su confianza, su implicación, trabajo, disposición y orientación durante todo este proceso, por brindarme su experiencia y por la invaluable ayuda que he recibido desde el primer momento sin la cual me hubiera sido más difícil terminar este trabajo, gracias de corazón.

A la Dra. Ana M. González Paramás, por su apoyo y permanente interés en el desarrollo de este trabajo, y su disposición constante en ayudarme.

A las Dras. Concepción García Moreno y María Jesús Peña Egido por su acogida y preocupación, por su dedicación, por haberme recibido con tanta amabilidad y porque siempre he sentido su apoyo en los momentos difíciles.

Al Dr. Juan Cabello del grupo de investigación del CIBIR- Logroño quiero agradecer su interés, amabilidad, así como el apoyo al proporcionarnos los gusanos, como su colaboración en la comprensión de todo lo relacionado al gusano.

A los profesores del departamento Julián, Maite, Pilar, Milagros, César, Alfonso, Rafael que siempre me brindaron su apoyo, por su interés amabilidad y consejos.

A las compañeras y compañeros de laboratorio (quienes me enseñaron a salir de cañas): Susana, Matilde, Cristina, Natalia, Rebeca, María, Laura, Raúl, José Miguel, Nacho y José Luis con los cuales he compartido vivencias importantes (como ¡aprender español!) y quienes me han animado en todo instante, por su apoyo en los momentos difíciles en los cuales siempre mostraron mucha disposición para resolver las dudas e inquietudes, por su acogida desde el primer momento de mi llegada a este departamento. Agradecer también aquellos que ya no están: Kike, Hugo.

Una Mención especial a María José (gracias mi niña) por estar allí, siempre dispuesta ayudar cuando se le necesita y a José Joaquín por su apoyo técnico y logístico.

Al Profesor José David Urchaga de la Universidad Pontificia que nos ayudo a comprender la estadística de la curva de supervivencia del gusano.

A las personas que fuera del laboratorio han sido un apoyo importante en esta etapa y permitieron que mi estancia en Salamanca fuera agradable, por su tolerancia, la amistad que me han brindado: Miguel Ángel (el cura), Carolina, Joaquín, Patricia, Juan Miguel, Vanesa, Ignacio, María y otros que partieron a sus tierras.

Un especial agradecimiento a aquellos amigos y antiguos compañeros que a pesar de la distancia siempre han brindado su ánimo y apoyo para culminar este proyecto: Mónica, Yanina, Manuel, Coco, Palomo, Edith.

A mi familia: madre, hermanos y sobrinas que desde la distancia siempre estuvieron conmigo brindándome su incondicional apoyo y cariño en los momentos buenos y en los malos, que los ha habido y especial a mi madre por su fortaleza y amor así como al estímulo que siempre supo brindarme para llevar a buen término este proyecto.

Si me olvido de alguien que me disculpe, a todos gracias mil de todo corazón.

A mi Madre

ABREVIATURAS

ABC: Área bajo la curva

ABTS: 2,2'-azino-bis(3etilbenzotiazolina-6-sulfónico ácido) sal diamonio

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosin difosfato

amu: Unidad de masa atómica

ATP: Adenosin trifosfato

BHT: Hidroxi butil tolueno

BSA: Albúmina de suero bovino

C: Catequina

CBG: β -glucocidasa citosólica

CG-MS: Cromatografía de gases- espectrometría de masas

CI50: Concentración que inhibe el 50 por ciento de la peroxidación lipídica

DAD: Detector de fotodiodos alineados

DE: Desviación estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNPH: Dinitrofenil hidrazina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

dsARNi: doble cadena Ácido ribonucleico de interferencia

EC: Epicatequina

ECG: Epicatequina 3-O-galato

EGC: Epigallocatequina

EGCG: Epigallocatequina 3-O-galato

ESI: Ionización por electrospray

ESR: Espectrometría de resonancia del spin del electrón

ETC: Cadena de transporte de electrones

FAD: Dinucleótido de Flavin-adenina

FRAP: Poder antioxidante de reducción del hierro

GSH: Glutación

GSSG: Glutación oxidado

GTP: Guanidin trifosfato

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HSP: Proteína de shock térmico

INRA: Instituto científico de investigación agronómica, Francia

LB: Caldo lactosa

LC-MS: Cromatografía líquida-espectrometría de masas

LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LPH: Lactasa florizín hidrolasa
m/z: Relación masa/carga
MS: Espectrometría de masas
NAD: Dinucleótido de nicotinamida
NGM: Medio de cultivo nematodo
NO: Oxido nítrico
NOS: Especies Reactivas de Nitrógeno
O₂: Oxígeno
O₂^{·-}: Radical superóxido
OH[·]: Radical hidroxilo
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PBS: Solución amortiguadora de fosfato
Q3G: Quercetina 3-*O*-glucósido
RMN: Resonancia magnética nuclear
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RPM: Revoluciones por minutos
SDS: Dodecil sulfóxido sódico
SGLT-1: Transportador de glucosa sodio-dependiente
SO₂: Dióxido de azufre
SOD: Superóxido dismutasa
TCA: Ácido tricarboxílico
TEAC: Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
TFA: Ácido trifluoroacético
t_R: Tiempo de retención
UDP: Uridin difosfato
USDA: Departamento de agricultura de los Estados Unidos,
Uv: Ultravioleta

ÍNDICE

I. INTERÉS Y OBJETIVOS	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Flavonoides	9
2.1.1. Flavonoles y flavonas	11
2.1.2. Flavanonas	12
2.1.3. Calconas	13
2.1.4. Flavan-3-oles	14
2.1.5. Isoflavonas	17
2.1.6. Antocianos	18
2.1.7. Flavonoides y Alimentos	18
2.1.8. Flavonoides y Actividad Antioxidante	23
2.1.9. Metabolismo y biodisponibilidad de flavonoides	24
2.2. <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
2.2.1. Características	26
2.2.2. Sexo	27
2.2.3. Anatomía	28
2.2.4. Cromosomas	30
2.2.5. Ciclo de vida	30
2.2.6. Desarrollo	31
2.2.7. <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo	32
2.2.8. <i>Caenorhabditis elegans</i> y Flavonoides	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Materiales y Equipos	43
3.1.1. Equipos	43
3.1.2. Reactivos y disolventes	44
3.1.3. Material biológico	44
3.2. Métodos generales	44
3.2.1. Preparación de placas petri NGM	44
3.2.2. Preparación de medios de bacterias y sembrados de Placas	45
3.2.3. Sincronización de Gusanos	46
3.2.4. Preparación de placas petri para los ensayos con Flavonoides	46
3.2.5. Efectos sobre características fenotípicas	47
3.2.5.1. Efectos sobre la reproducción	47
3.2.5.2. Efectos sobre la longitud del cuerpo	47
3.2.6. Ensayos de estrés térmico	48
3.2.7. Ensayos de estrés oxidativo	48

3.2.8. Ensayos de longevidad	49
3.2.9. Captación y metabolismo de flavonoides	49
3.2.10. Determinación de proteínas	50
3.2.11. Análisis de HPLC-DAD-ESI/MS	51
3.2.12. Síntesis y purificación de metilados de epicatequina	54
3.2.13. Cuantificación de ARNm PCR en tiempo real	54
3.2.14. Análisis de oxidación de proteínas	55
IV. ESTUDIOS PRELIMINARES	57
4.1. Introducción	59
4.2. Optimización de las condiciones de disolución y concentración de los compuestos en el medio	60
4.3. Ensayos de estabilidad de flavonoides en el medio	62
4.4. Influencia de bacterias sobre la incorporación y metabolización	64
4.5. Optimización de la determinación de proteínas en <i>C. elegans</i>	66
V. ESTUDIO SOBRE LOS EFECTOS DE QUERCETINAY SUS METABOLITOS O-METILADOS SOBRE ESTRÉS OXIDATIVO, TERMOTOLERANCIA, LONGEVIDAD Y BIODISPONIBILIDAD EN <i>C. elegans</i>	69
5.1. Introducción	71
5.2. Resultados y Discusión	73
5.2.1. Características fenotípicas	73
a) Longitud del cuerpo	73
b) Reproducción	74
5.2.2. Estrés térmico	76
5.2.3. Estrés oxidativo	79
5.2.4. Longevidad	82
5.2.5. Captación y biodisponibilidad	85
5.3. Conclusiones parciales	91
VI. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DE QUERCETINA 3-O-GLUCÓSIDO Y QUERCETINA SOBRE ESTRÉS OXIDATIVO, TERMOTOLERANCIA, LONGEVIDAD Y BIODISPONIBILIDAD EN <i>C. elegans</i>	95
6.1. Introducción	97
6.2. Resultados y Discusión	99
6.2.1. Captación y biodisponibilidad	99
6.2.2. Longevidad	107
6.2.3. Estrés térmico	111
6.2.4. Estrés oxidativo	113
6.2.5. Características fenotípicas	116

a) Longitud del cuerpo	116
b) Reproducción	117
6.3. Conclusiones parciales	118
VII. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE CATEQUINA, EPICATEQUINA Y SUS METABOLITOS O-METILADOS SOBRE ESTRÉS OXIDATIVO, TERMOTOLERANCIA, LONGEVIDAD Y BIODISPONIBILIDAD EN <i>C. elegans</i>	121
7.1. Introducción	123
7.2. Resultados y Discusión	125
7.2.1. Características fenotípicas	125
a) Longitud del cuerpo	125
b) Reproducción	127
7.2.2. Estrés térmico	128
7.2.3. Estrés oxidativo	130
7.2.4. Longevidad	133
7.2.5. Captación y biodisponibilidad	138
7.3. Conclusiones parciales	141
VIII. CONCLUSIONES GENERALES	143
IX. BIBLIOGRAFÍA	149
X. ANEXO	179

I. INTERÉS Y OBJETIVOS

Las plantas contienen una variedad de compuestos polifenólicos que no están involucrados en su metabolismo primario, pero que poseen papeles importantes, como disuadir a los herbívoros o proteger contra el daño inducido por la radiación UV o contra las condiciones de estrés (Kampkötter *et al.*, 2007). Entre estos compuestos, los flavonoides son metabolitos secundarios de vegetales que están ubicuamente representados en plantas y en alimentos derivados.

Los flavonoides tienen importantes efectos en la bioquímica y fisiología de las plantas, actuando como antioxidantes, inhibidores enzimáticos, precursores de sustancias tóxicas o pigmentos. Están involucrados en la fotosensibilización y reacciones de transferencia de energía, actividad de hormonas y reguladores del crecimiento de las plantas, control de la respiración y fotosíntesis, morfogénesis y determinación de sexo, o mecanismos de defensa contra insectos. En algunos estudios se ha descrito que son capaces de activar los genes de nodulación bacteriana implicados en el control y fijación de nitrógeno, lo cual sugiere una importante relación entre flavonoides particulares y la activación de genes de expresión (Middleton y Kandaswami, 1993).

Existen distintas clases de flavonoides, como flavonas, flavonoles, flavanoles, antocianos, calconas, flavanonas, isoflavonas o dihidrocalconas, que poseen un notable espectro de acciones bioquímicas y farmacológicas, y cuya presencia en los alimentos se ha asociado a efectos beneficiosos para la salud humana, lo que ha llevado a considerarlos componentes funcionales de los alimentos. Quercetina, un flavonol, y catequinas, del grupo de los flavanoles, se encuentran entre los flavonoides más abundantes en la dieta, estando presentes en alimentos como manzanas, brócoli, cebollas, té verde, cacao o uvas. La ingesta dietética media de flavonoles se ha estimado en 20-35 mg/día y la de catequinas en 18-50 mg/día (Manach *et al.*, 2004), aunque existen grandes diferencias individuales en función de los hábitos dietéticos. Son varios los estudios epidemiológicos que han relacionado la ingesta de flavonoides con efectos benéficos frente a varias enfermedades, incluyendo diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos. Así, los flavonoides se han relacionado con distintos tipos de actividades biológicas, como actividades anti-alérgicas, anti-inflamatorias, antivirales, antiproliferativas o anti-carcinogénicas, que podrían ser ejercidas en el organismo de los mamíferos (Williams *et al.*, 2004). Aunque los mecanismos precisos de estos efectos no están bien elucidados, clásicamente se han relacionado con su actividad antioxidante y captadora de radicales libres (Noroozi *et al.*, 1998; Middleton *et al.*, 2000), así como con su capacidad para quelar metales o reaccionar con proteínas (Haslam, 1998). Por otra parte, en ensayos en sistemas *in vitro* se ha demostrado que son capaces de

modular la actividad de una gran variedad de enzimas con importantes papeles en el organismo, lo que también podría contribuir a los efectos biológicos atribuidos a los flavonoides contenidos en alimentos (Manach *et al.*, 2004).

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados, la mayoría de los conocimientos sobre efectos biológicos de los flavonoides se han originado en estudios *in vitro*, mientras que datos de estudios *in vivo* que tengan en cuenta la compleja interacción de diversos procesos de digestión, metabolismo e interacciones en un organismo completo son limitados. Por esta razón, en este trabajo se ha utilizado el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) para el estudio de las actividades y posible modo de acción de los flavonoides.

En 1963, Sydney Brenner observó que parte del éxito de la biología molecular se basaba en la utilización de organismos muy simples, por ejemplo fagos bacterianos, como sistemas modelos. Consciente de la importancia de estos sistemas sencillos en la investigación biológica, introdujo *C. elegans* como organismo modelo para actividades de investigación en biología y neurología. Desde su introducción por Brenner, este nematodo ha sido ampliamente usado con fines de investigación, desarrollándose una sofisticada infraestructura de conocimientos con protocolos y métodos de experimentación libremente diseminados (Wood, 1988). En tiempos recientes este modelo ha aumentado su popularidad para la realización de estudios *in vivo* con compuestos de origen vegetal farmacológicamente activos. Existen varias características que hacen de *C. elegans* un modelo ideal para el estudio de la función y regulación de los genes, entre las que se puede destacar (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Guarente y Kenyon, 2000):

- Es un organismo eucariota, lo cual significa que comparte estructuras celulares y moleculares (membranas de los organelos; complejo de ADN dentro de la cromatina y organizado dentro de cromosomas, etc.), y rutas de control de organismos superiores.
- Es un organismo multicelular que pasa a través de un proceso complejo de desarrollo, incluyendo embriogénesis, morfogénesis y crecimiento a adulto. Así, la información biológica que se obtiene del mismo puede ser aplicable a organismos más complejos, menos manejables de cara a realizar escrutinios en el laboratorio.
- Existen varias técnicas de biología molecular para experimentación en *C. elegans* que no están disponibles para grandes eucariotas, por ejemplo, manipulación del genoma por adición, remoción o alteración de genes específicos, que pueden realizarse por procedimientos relativamente rutinarios.

-
- El tamaño del genoma de *C. elegans* es relativamente pequeño ($9,7 \times 10^7$ pares de bases o 97 Megabases), comparado con el genoma humano, que se ha estimado que contiene 3 billones de pares de bases (3000 Megabases). El genoma entero de *C. elegans* está secuenciado y cerca del 40% de sus genes tienen ortólogos humanos.
 - *C. elegans* es fácil de mantener en el laboratorio, es pequeño y su anatomía es invariable de un organismo a otro. Además, tiene un ciclo de vida rápido: la embriogénesis ocurre en aproximadamente 12 horas, el desarrollo al estado adulto en 2,5 días, y la vida media es de 2 a 3 semanas.

El objetivo general que se plantea para el presente estudio es el de evaluar la actividad *in vivo* de quercetina y catequinas, y de algunos de sus principales metabolitos conjugados identificados en el organismo humano, partiendo de la base de que estos últimos podrían ser mediadores o actores finales de los efectos biológicos asociados al consumo de productos ricos en flavonoides. Se trata de obtener resultados sobre aspectos como:

- Biodisponibilidad, metabolización y posibles mecanismos de acción de los productos objeto de estudio.
- Influencia de dichos compuestos sobre la longevidad.
- Capacidad para modular el estrés oxidativo y térmico.
- Efectos sobre la reproducción y anatomía del nematodo.
- Variaciones de la expresión génica que contribuyan a explicar los posibles efectos observados.

A través de estos estudios se pretende contribuir al avance de los conocimientos en el campo de las relaciones alimentación/salud tratando de elucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales ejercen su acción los flavonoides presentes en los vegetales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. FLAVONOIDES

Los flavonoides son el grupo más importante de compuestos fenólicos. Se han descrito más de 8000 flavonoides naturales (Andersen y Markham, 2006) y continúan identificándose más compuestos pertenecientes a este grupo. Se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, vegetales, semillas, nueces, tallos y flores, así como en productos derivados de éstos, como té, vino, zumos o cerveza, los cuales son importantes constituyentes de la dieta humana.

La mayoría de los flavonoides existen en sus medios naturales en forma de derivados glicosílicos, aunque pueden también estar presentes como aglicones libres (Wollenweber, 1993). En la planta son sintetizados por una primera reacción entre fenilalanina y malonil-CoA para formar 4-cumaroil CoA, seguida por la condensación con posteriores unidades de malonil-CoA catalizadas por la calcona sintasa para producir naringenina (estructura en figura II.5). Esta flavanona, por tanto, es un importante precursor de numerosos flavonoides (Prasain y Barnes, 2007).

La base de la estructura flavonoide en su nivel más simple posee 15 átomos de carbono y consta de dos anillos fenilo (anillos A y B) unidos por un esqueleto de tres átomos de carbono (estructura $C_6-C_3-C_6$), que en la mayoría de las clases que conforman esta familia se encuentra formando un tercer anillo (anillo C) heterocíclico (Figura II.1).

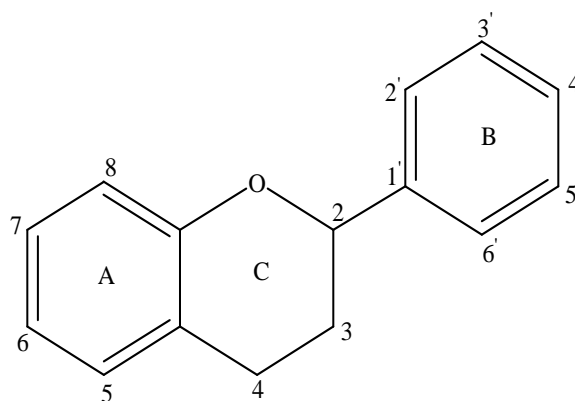


Figura II.1. Esqueleto básico de los flavonoides más abundantes.

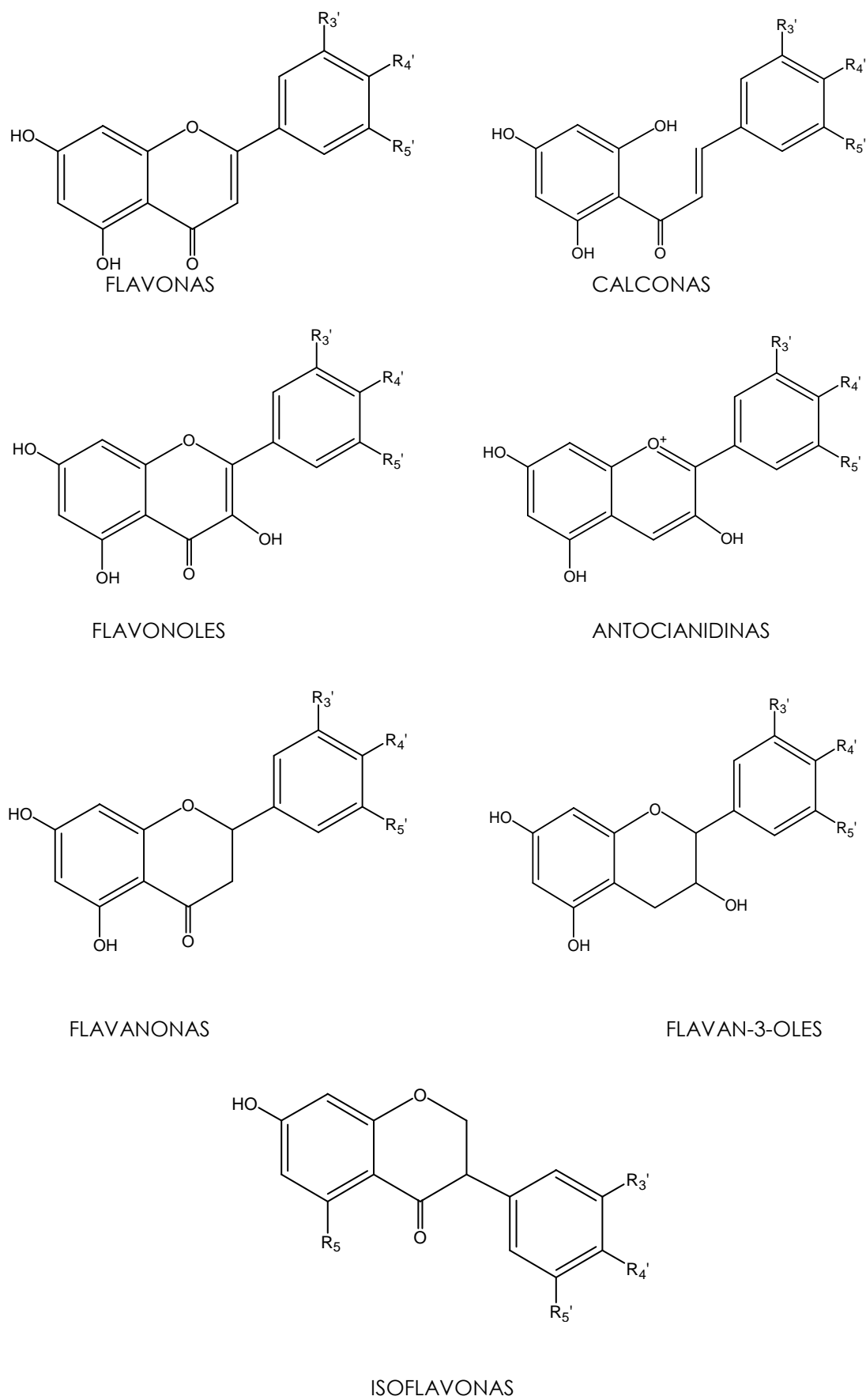


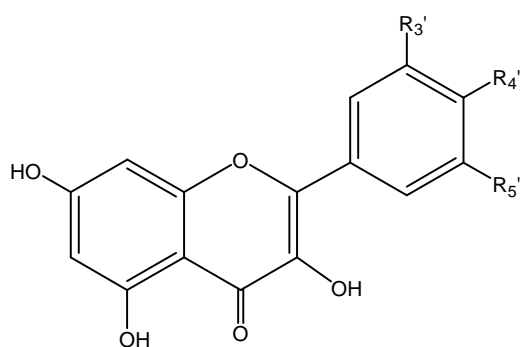
Figura II.2. Estructura básica de los principales grupos de flavonoides.

La clasificación habitual de los flavonoides se realiza de acuerdo al grado de insaturación y sustituyentes del anillo C. La figura II.2 muestra las estructuras básicas de las principales clases de flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavan-3-oles, isoflavonas, antocianidinas y calconas. Dentro de cada una de estas clases los distintos compuestos se diferencian entre sí por los sustituyentes de los anillos A y B y el tipo de sustitución en los diferentes hidroxilos de la molécula.

2.1.1. FLAVONOLES Y FLAVONAS

Ambos grupos de flavonoides se caracterizan por la presencia de un grupo cetónico en el carbono C₄ y una insaturación entre C₂ y C₃ del anillo C, pero se diferencian en la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 de dicho anillo en los flavonoles (Figura II.3). Esta mínima diferencia entre sus estructuras tiene importantes consecuencias fisiológicas y farmacológicas.

Estos compuestos están ampliamente distribuidos en plantas superiores. Sin embargo, en frutas, hortalizas y productos derivados sólo están presentes de forma predominante los flavonoles, principalmente quercetina, miricetina y kaempferol, que se diferencian en los sustituyentes del anillo B, tal como se recoge en la figura II.3.



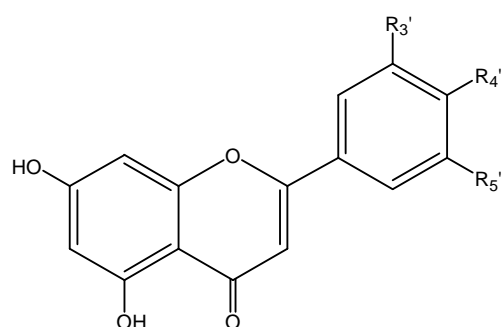
Flavonoles	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Miricetina	OH	OH	OH
Quercetina	OH	OH	H
Kaempferol	H	OH	H
Isoramnetina	OCH ₃	OH	H
Tamarixetina	OH	OCH ₃	H

Figura II.3. Estructura química de algunos flavonoles.

Los flavonoles existen normalmente en sus medios naturales en forma glicosilada y/o acilada. La posición más frecuentemente implicada en la glicosilación es la 3, aunque también puede darse en 5 y 7, siendo la glucosa el azúcar más frecuente, aunque también aparecen xilosa, ribosa, fructosa y ramnosa o diglicósidos como

rutinosa. Cuando existen acilaciones, los ácidos implicados pueden ser *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, *p*-hidroxibenzoico, gálico, acético y malónico.

Las flavonas son encontradas principalmente en cereales y hortalizas. En la figura II.4 se muestran algunas flavonas frecuentes en alimentos.

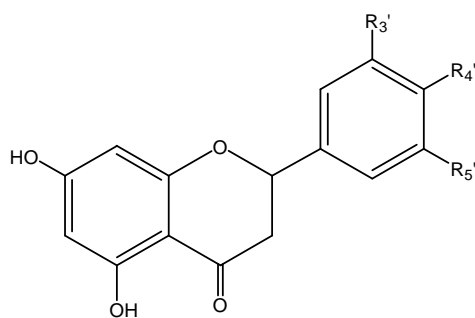


Flavonas	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Apigenina	H	OH	H
Luteolina	OH	OH	H
Crisina	H	H	H
Tricina	OCH ₃	OCH ₃	H
Acacetina	H	OCH ₃	H

Figura II.4. Estructura química de algunas flavonas.

2.1.2. FLAVANONAS

Las flavanonas son análogos de las flavonas con el anillo C saturado (Figura II.5), por este motivo se las denomina también dihidroflavonas. Su molécula tiene propiedades ópticas al ser el carbono en posición 2 del heterocíclico un centro de asimetría. Se las considera un grupo minoritario de flavonoides, excepto en casos especiales como en el género *Citrus*. En el pomelo la naringenina es el aglicón más abundante, mientras que en la naranja es la hesperetina, y el eriodictiol en el limón (Figura II.5). Biogenéticamente las calconas son los precursores inmediatos de las flavanonas, y algunas flavanonas isomerizan por apertura de anillo en calconas durante el aislamiento desde las plantas o después de un tratamiento químico con álcali. Como se ha señalado anteriormente, las flavanonas son intermediarios en la biosíntesis de la mayoría de otros grupos de flavonoides, incluyendo flavonas, flavonoles e isoflavonoides.



Flavanonas	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Naringenina	H	OH	H
Hesperetina	OH	OCH ₃	H
Eriodictiol	OH	OH	H
Taxifolina*	OH	OH	H

* hidroxilada adicionalmente en posición 3

Figura II.5. Estructura química de algunas flavanonas.

2.1.3. CALCONAS

Las calconas son consideradas también flavonoides minoritarios. Por carecer del anillo heterocíclico central tienen una numeración diferente al resto de flavonoides para la localización de sus átomos de carbonos (Figura II.6). Son estructuras de gran significación biosintética como precursores inmediatos en la síntesis de los flavonoides en los tejidos vegetales. La isomerización específica de calconas a flavanonas en las plantas, catalizada por la enzima calcona isomerasa, es reversible. Además, este tipo de estructuras pueden aparecer en los equilibrios que se establecen en disoluciones acuosas de antocianos a medida que aumenta el pH.

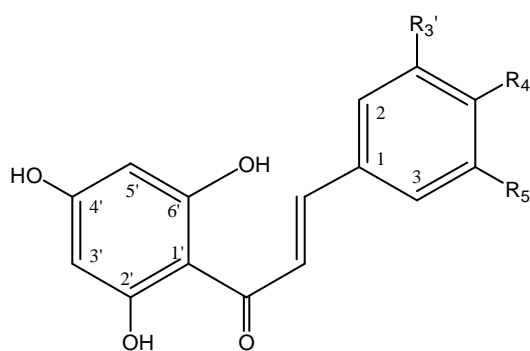
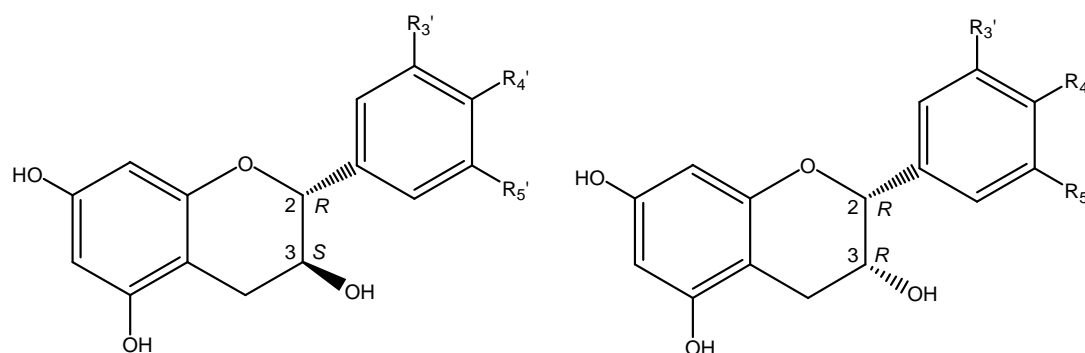


Figura II.6. Estructura química de calconas.

2.1.4. FLAVAN-3-OLES

Los flavan-3-oles, son flavonoides que carecen del grupo ceto en posición 4, tienen el anillo C totalmente saturado y poseen dos carbonos quirales en posiciones 2 y 3. Los derivados más habituales poseen configuración *R* en el carbono 2 (Figura II.7), existiendo tanto formas *2R*, *3S* (*trans*), (p. ej., catequina, galocatequina), como sus correspondientes isómeros *2R*, *3R* (*cis*), en los cuales se antepone al nombre el prefijo *epi* (p. ej., epicatequina, epigalocatequina). En raras ocasiones la configuración del carbono 2 es *S* y en ese caso se antepone al nombre del compuesto el prefijo *enantio* (*ent-*). La ausencia de prefijo indica la existencia de la configuración *2R*. También es común referirse a las formas *2R* con el prefijo (+) y las *2S* como (-), como se recoge en la figura II.7. Los flavan-3-oles monómeros se suelen denominar genéricamente catequinas.



Flavan-3-oles	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	C-2	C-3
(+)-Galocatequina	OH	OH	OH	<i>R</i>	<i>S</i>
(+)-Catequina	OH	OH	H	<i>R</i>	<i>S</i>
(+)-Afzelequina	H	OH	H	<i>R</i>	<i>S</i>
(+)-Epigalocatequina	OH	OH	OH	<i>R</i>	<i>R</i>
(+)-Epicatequina	OH	OH	H	<i>R</i>	<i>R</i>
(+)-Epiáfzelequina	H	OH	H	<i>R</i>	<i>R</i>

Figura II.7. Estructura química de los principales flavan-3-oles monómeros.

Los flavan-3-oles se pueden encontrar en la naturaleza como tales o, menos habitualmente, en forma de derivados metilados, glicosilados o como ésteres, por ejemplo con el ácido gálico (p.ej., epigallocatequina-3-O-galato, que es un flavanol mayoritario en té verde).

Los flavan-3-oles existen habitualmente en forma polimerizada, originando los denominados taninos condensados. Éstos tienen la capacidad de dar lugar a antocianidinas por calentamiento en medio ácido mineral, por lo que también se les denomina proantocianidinas. Según den lugar en su hidrólisis a cianidina, delphinidina o pelargonidina se distingue entre procianidinas, prodelfinidinas y propelargonidinas, respectivamente.

Los taninos condensados se clasifican, de acuerdo al número de unidades básicas elementales que entren a formar parte de su estructura, en oligómeros y polímeros (cuando poseen más de 5 unidades flavan-3-ol básicas). Los enlaces interflavánicos, entre las unidades monómeras que constituyen las proantocianidinas, pueden producirse entre el carbono 4 del anillo C de la subunidad superior y el 8 de la inferior o, menos frecuentemente, el 6 de la unidad inferior. Las proantocianidinas diméricas que presentan este tipo de enlaces C-C corresponden a los compuestos inicialmente designados como proantocianidinas de tipo B. Existen también dímeros llamados de tipo A, que presentan una doble unión interflavánica: además del enlace carbono-carbono, poseen otro enlace de tipo éter entre C₂ y C₇ o C₅ (Figura II.8).

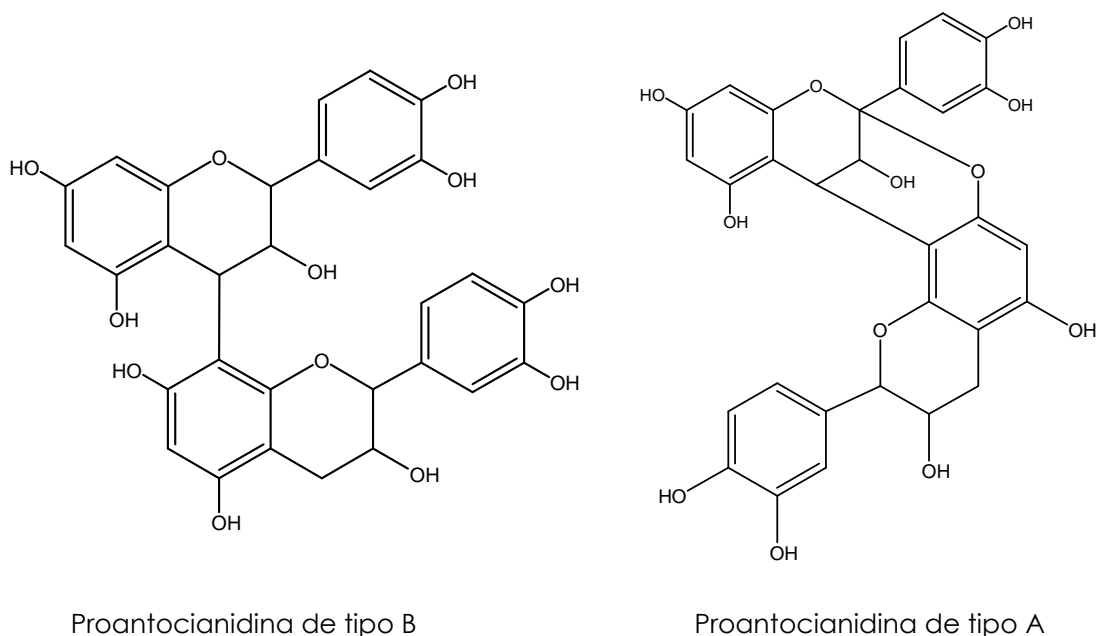


Figura II.8. Proantocianidinas dímeras de tipo B y A.

La nomenclatura más aceptada para las proantocianidinas es la propuesta por Hemingway *et al.* (1982), donde se nombra los tipos de unidades elementales que la conforman (p.ej., catequina, galocatequina, epicatequina 3-O-galato) y se indica el enlace interflavánico entre ellas de la misma forma que se hace para los oligosacáridos, es decir, se incluyen los átomos que intervienen en el enlace y su dirección entre paréntesis (4→6; 4→8). En algunos compuestos concretos y por su amplia aceptación, se emplea también la denominación trivial utilizada por Weinges *et al.* (1986) para designar algunos dímeros y trímeros, así como abreviaturas para los seis monómeros más frecuentes (Tabla II.1).

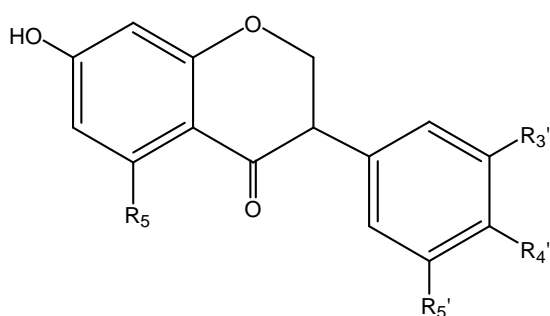
Tabla II.1. Nomenclatura abreviada de los flavanoles más habituales.

Denominación abreviada	Denominación común
C	Catequina
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina-3-O-galato
GC	Galocatequina
EGC	Epigalocatequina
EGCG	Epigalocatequina-3-O-galato
B1	Epicatequina-(4→8)-catequina
B2	Epicatequina-(4→8)-epicatequina
B3	Catequina-(4→8)-catequina
B4	Catequina-(4→8)-epicatequina
B5	Epicatequina-(4→6)-epicatequina
B6	Catequina-(4→6)-catequina
B7	Epicatequina-(4→6)-catequina
B8	Catequina-(4→6)-epicatequina
A1	Epicatequina-(4→8, 2→7)-epicatequina
A2	Epicatequina-(4→8, 2→7)-catequina
C1	Epicatequina-(4→8)-epicatequina-(4→8)-epicatequina
C2	Catequina-(4→8)-catequina-(4→8)-catequina

Las proantocianidinas altamente polimerizadas podrían ser más abundantes en la naturaleza que los oligómeros (Haslam, 1989), pero están aún mal caracterizadas, debido a su difícil extracción y separación. No obstante, los oligómeros parecen ser los principales responsables de buena parte de las reacciones biológicas atribuidas a los taninos condensados como son su capacidad de reaccionar mediante enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con proteínas, la cual se denomina astringencia, actividad antimicrobiana y antifúngica, Inhibidores enzimáticos.

2.1.5. ISOFLAVONAS

Las isoflavonas poseen un esqueleto 3-fenilcromano que es biogenéticamente derivado de la reestructuración del sistema flavonoide 2-fenilcromano por medio de un reordenamiento 1,2-aril. Las isoflavonas se encuentran mayoritariamente en especies de la familia Leguminosae. Las principales fuentes de isoflavonas en la dieta humana son la soja y los productos derivados de ella, donde compuestos mayoritarios derivan de dos aglicones: genisteína y daidzeína (Figura II.8). Son flavonoides que presentan algunas características estructurales similares a los estrógenos. Aunque no son esteroides, presentan grupos hidroxilo en las posiciones 4' y 7 de la molécula, configuración análoga a la de los hidroxilos en la molécula de estradiol. Este hecho les confiere propiedades pseudohormonales, por lo que son clasificadas como fitoestrógenos.

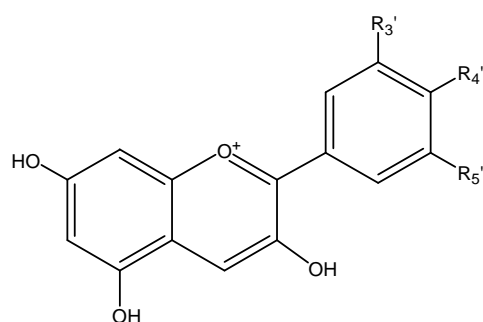


Isoflavonas	R ₅	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Daidzeína	H	H	OH	H
Genisteína	OH	H	OH	H

Figura II.8. Isoflavonas más habituales en la soja y derivados.

2.1.6. ANTOCIANOS

El término antociano, proviene del griego *anthos*, que significa flor y *kianos* que significa azul. Son pigmentos característicos de vegetales, donde son responsables de una amplia variedad de colores: naranja, rosa, escarlata, rojo, malva, violeta y azul. En sus medios naturales se encuentran presentes en forma de heterósidos, cuyo aglicón, derivado del ion flavilio o fenil-2-benzopirilio, está hidroxilado y metoxilado en diferentes posiciones (Figura II.9). El aglicón, o antocianidina, está unido a una o varias moléculas de azúcar, las cuales pueden estar, a su vez, aciladas con diferentes ácidos orgánicos. Los glicósidos de las antocianidinas se denominan antocianinas o antocianos.



Antocianidinas	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Pelargonidina	H	OH	H
Cianidina	OH	OH	H
Delfinidina	OH	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	OH	H
Petunidina	OCH ₃	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura II.9. Estructuras de las antocianidinas mayoritarias.

Los antocianos pueden estar presentes en todos los órganos de las plantas: frutos, flores, tallos, hojas y raíces. Suelen encontrarse en disolución dentro de las vacuolas celulares (Strack *et al.*, 1989). Las principales fuentes dietéticas de antocianos son las frutas, especialmente las bayas, y en menor medida las verduras y cereales.

2.1.7. FLAVONOIDES Y ALIMENTOS

Una dieta inadecuada es uno de los factores que más contribuyen a la etiología de enfermedades crónicas como son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, definir qué constituye una dieta saludable es un asunto complejo, pues es difícil relacionar de manera concluyente las propiedades beneficiosas o perjudiciales con componentes concretos de los muchos contenidos en la diversidad de alimentos que consumimos. Existen, no obstante, considerables evidencias de que

un adecuado consumo de frutas y hortalizas juega un destacado papel en el mantenimiento de la salud y prevención de enfermedades (Kyle y Duthie, 2006). Algunos de estos efectos promotores de la salud relacionados con el consumo de vegetales se han asociado a su contenido en compuestos fenólicos, y flavonoides en particular, los cuales están ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal. No obstante, desde una perspectiva nutricional, la importancia real de los flavonoides en la promoción de la salud y la disminución del riesgo de padecer enfermedades no está en absoluto clara. A diferencia de los nutrientes reconocidos, una falta de flavonoides en la dieta no da lugar a síndromes obvios de deficiencia. Por ello la clasificación inicial de algunos flavonoides cítricos como vitaminas ("vitamina P" o citrina) realizada por St Rusznyak y Szent-Gyorgy en 1936 fue posteriormente rechazada por la FDA en 1968.

El tipo y cantidad de flavonoides ingeridos con la dieta depende del tipo y cantidad de alimentos vegetales ingeridos y de las variaciones en su composición determinadas por razones genéticas, agronómicas y climáticas, y los modos de consumo y de preparación. De esta manera, las cantidades ingeridas pueden oscilar por muchos órdenes de magnitud en función del origen de los alimentos y los hábitos alimentarios. Una primera estimación realizada por Kühnau, (1976) cifraba el consumo total de flavonoides en torno a 1 g/día en los EEUU. Esta aproximación incluía flavanonas, flavonoles y flavonas (160 a 175 mg/día), antocianinas (180 a 215 mg/día), catequinas (220 mg/día), y biflavanos (460 mg/día), si bien estaba basada en medidas espectrofotométricas semicuantitativas. Posteriormente estas cantidades se han ido revisando a medida que han avanzado las técnicas analíticas y, aunque los resultados son extremadamente variables en función de autores, en general se suelen estimar niveles más bajos de consumo. A pesar de ello, hay una gran cantidad de flavonoides unidos a estructuras de matriz y/o insolubles que no pueden ser adecuadamente analizados y que podrían ser componentes mayoritarios en muchos alimentos, lo que hace que en general las estimaciones disponibles lo sean por defecto (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Además de numerosa bibliografía al respecto, existen dos grandes bases de datos en las cuales se pueden consultar los contenidos de flavonoides en alimentos: una desarrollada en Francia por el INRA (www.phenol-explorer.eu) y otra en Estados Unidos por la USDA (www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp).

FRUTAS

(Kyle y Duthie 2006; de Pascual-Teresa *et al.*, 1998; Fraga, 2010; www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/08/2010; www.phenol-explorer.eu).

Catequinas, flavonoles, antocianos y proantocianidinas son los flavonoides más abundantes en frutas. En contraste, flavanonas y flavonas suelen estar restringidas a variedades cítricas tales como naranjas y limones. En muchas frutas (p. ej., manzanas), los flavonoides están principalmente presentes en la piel por lo que el pelado reduce significativamente sus niveles. Las uvas tintas son una de las fuentes más ricas de catequinas seguidas de manzanas. La catequina es también relativamente abundante en frutas de hueso, como ciruela y albaricoque. Las fresas, por su parte, poseen una mezcla compleja de catequinas, que comprende C (aproximadamente 75% total catequinas), ECG (17% de total de catequinas), EGC (5% de total de catequinas), y GC (3% de total de catequinas). Las procianidinas tipo B están también presente en frutas como manzanas, ciruela y melocotón. Sin embargo, las frutas cítricas no parecen contener niveles detectables de catequinas o procianidinas.

La quercetina es el flavonol más común en frutas, siendo las bayas (saúco, "lingonberries" o arándano) fuentes particularmente ricas. Las bayas en general, y especialmente las grosellas, son también las frutas que contienen más kaempferol y miricetina. Aunque estos dos flavonoles son también abundantes en frutas como melocotón o peras, en las mismas están acumulados en la piel y las concentraciones son generalmente bajas si se considera la fruta entera.

Las flavanonas, como se ha indicado anteriormente, son características de frutas cítricas. La naringenina está presente en mayor concentración que la hesperidina en el pomelo, mientras que la última es la forma dominante en naranjas, limones y limas. Aunque las frutas cítricas también contienen ciertos niveles de flavonas, la oliva es con diferencia la fuente más rica de luteolina y apigenina.

Las antocianinas se encuentran en abundancia en uvas tintas, siendo los glicósidos de malvidina las más características. Otras frutas tales como arándano, mora, fresa, frambuesa, fresa, zarzamora contienen también una amplia variedad de derivados de antocianidinas.

HORTALIZAS Y VERDURAS

(Ferrerres *et al.*, 1997; Kyle y Duthie 2006; Fraga 2010).

Las especies de hortalizas de los géneros *Allium* (p. ej. cebollas), *Brassica* (brócoli y col), *Lactuca* (lechuga) y *Lycopersicon* (tomate) son abundantes fuentes de flavonoles, principalmente quercetina y kaempferol. Las especies de *Allium*, y especialmente el ajo y las cebollas rojas, constituyen una de las fuentes potencialmente más ricas de quercetina, con niveles del orden de hasta unos 100 mg/100 g. Algunos vegetales de estos grupos, como apio, pimientos y lechuga, también contienen flavonas, aunque los pimientos verde son de los pocos vegetales que poseen tanto flavonoles como flavonas en niveles relativos destacados. El tomate es la única hortaliza (taxonómicamente un fruto) que contiene algunas flavanonas, como naringenina y hesperidina. El apio y el pimiento dulce, por su parte, son los principales alimentos fuentes de flavonas cuando este grupo de flavonoides se considera de manera independiente.

Las verduras y raíces de vegetales no suelen contener cantidades significativas de catequinas y proantocianidinas, al contrario que las legumbres, que son buenas fuentes de los mismos. Además, las cebollas y lechugas rojas son alimentos ricos en antocianinas, siendo el principal componente los glicósidos de cianidina. También se encuentran antocianinas aciladas en el género *Brassica*.

Existe una variedad de maíz morado que contiene un alto contenido de antocianinas, especialmente cianidina-3-glucósido y varios glicósidos de pelargonidina, peonidina y delfinidina (de Pascual-Teresa *et al.*, 2002). Los antocianos también se encuentran en tubérculos, como los pigmentados de procedencia andina "pinta boca" (*Solanum stenotomum*), principalmente como petunidina-3-O-p-cumarilrutinosido-5-O-glucósido y en menores cantidades peonidina, malvidina y delfinidina aciladas, o "isla oca" (*Oxalis tuberosa*), en la cual predominan los glucósidos de malvidina y diglucósidos de petunidina y peonidina (Alcalde-Eon *et al.*, 2004).

BEBIDAS

(Justensen *et al.*, 1998; de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Kyle y Duthie, 2006; Muller *et al.*, 2007).

Las catequinas son flavonoides comunes en bebidas como zumos de frutas, té y vino. Estos contienen mezclas complejas de catequinas simples y sus ésteres galato, aunque también suelen poseer ciertos niveles de proantocianidinas, especialmente en

el caso del vino tinto. Los flavonoles están también presentes en estas bebidas, mientras las flavanonas están nuevamente restringidas a jugos cítricos, como los de pomelo y naranja. La presencia de flavonas en bebidas no está bien descrita. El zumo de manzana es uno de lo más ricos en catequinas, mientras el de arándano contiene más flavonoles, principalmente en forma de quercetina y miricetina.

El té es la fuente alimenticia más importante de polifenoles y taninos, y sus principales componentes son epigallocatequina-galato (EGCG) con cerca del 50% y epicatequina-galato (ECG) 27%, epigallocatequina (EGC), epicatequina (Ec) y catequina contenidas en té verde. El té también contiene otros flavonoides, como quercetina, kaempferol, y miricetina.

El vino posee una compleja mezcla de catequinas y procianidinas, y también ciertos niveles de flavonoles y flavanonas. El vino tinto contiene mayor niveles de flavonoides que el blanco o rosado. Las procianidinas usualmente representan en torno 50% de los flavonoides encontrados en vino tinto, seguido por catequinas (37%), los antocianos se encuentran principalmente en el vino tinto joven, con una elevada proporción de derivados de malvidina. También la cerveza contiene flavonoides, con predominio de procianidinas (42% del total del contenido de flavonoides).

ALIMENTOS DIVERSOS

La miel es el único alimento de origen animal que contiene ciertos niveles de flavonoides, como flavonoles y flavonas o la flavanona naringenina.

El cacao es una buena fuente de catequinas, y procianidinas de tipo B. El chocolate negro contiene catequina, epicatequina y procianidinas, con predominio de dímeros y trímeros (Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Schewe *et al.*, 2002).

Existen muchos factores que hacen difícil el análisis y estimación del contenido de flavonoides en los alimentos y de su ingesta dietética. Como se ha mencionado anteriormente, existe una gran discrepancia entre los valores de los flavonoides en los alimentos en función de los autores y estos valores pueden estar influidos por los métodos de extracción y análisis, las condiciones de cultivo, variedades, procesamiento, preservación y procedimientos de preparación doméstica, que pueden exponer los productos frescos a un riesgo aumentado de daño oxidativo, por la activación de enzimas oxidativas tales como polifenoloxidasas.

2.1.8. FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los polifenoles, y particularmente los flavonoides, son efectivos donadores de hidrógenos. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos, así como de la extensión de la conjugación y la presencia de grupos dadores de electrones en la estructura del flavonoide (Millar, 1997), debido a la capacidad que poseen los anillos aromáticos de asumir el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones π (Ramírez-Tortosa *et al.*, 2001). Cuanto mayor sea la capacidad para la deslocalización electrónica más eficaz es el flavonoide como antioxidante. De este modo, estructuras como las de los flavonoles (p.ej. quercetina), que poseen los tres anillos base conjugados son generalmente los de mayor actividad en este sentido.

En la estructura flavonoide, una actividad antioxidante óptima se ha relacionado con la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado. Los grupos hidroxilo libres en las posiciones 3 del anillo C y 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en posición 4, son donadores de electrones y su presencia mejora la capacidad antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996). Se ha demostrado que, los flavonoides con un mayor número de grupos hidroxilos tienen mayor actividad antioxidante, y que los que presentan hidroxilos libres en posiciones *orto* y *para* son más eficaces que cuando la hidroxilación se produce en posiciones 5 y 7 (*meta*). El grado de glicosilación también afecta significativamente a las propiedades antioxidantes de este grupo de compuestos, siendo más activos los aglicones que las formas glicosiladas (Kuskoski *et al.*, 2004; Wang, 1997).

La quercetina, que posee un grupo hidroxilo en posición 3 y un doble enlace en posición 2,3, adyacente a un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, muestra mayor actividad en el ensayo TEAC, de naturaleza acuosa, que la catequina que sólo cumple la primera característica estructural (Rice-Evans *et al.*, 1998; Plumb *et al.*, 1998; Dueñas *et al.*, 2010). Sin embargo, estas características estructurales no parecen afectar a la actividad en los ensayos donde el sustrato es lipídico, en los cuales quercetina y catequina han mostrado capacidades similares en la inhibición de la peroxidación lipídica (Plumb *et al.*, 1998). La actividad de la catequina para reducir la peroxidación lipídica se ve disminuida cuando se encuentra galoilada en posición 3 del anillo C, en contraste la capacidad para captar el radical ABTS^{•+} se ve aumentada. El mismo efecto se ha observado cuando aumenta el grado de polimerización de las catequinas de monómero a tetrámero. Sin embargo, la glicosilación de la molécula de catequina, produce una pérdida de la actividad antioxidante medida a través de ambos métodos, que resulta más evidente en su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica (Plumb *et al.*, 1998).

2.1.9. METABOLISMO Y BIODISPONIBILIDAD DE FLAVONOIDES

(Manach, 2004; Prasain y Barnes, 2007; Holst y Williamson, 2008; Prasain *et al.*, 2010).

Los factores que afectan la biodisponibilidad de un compuesto en humanos pueden ser divididos en factores exógenos, tales como la complejidad de la matriz (ésta tiene un importante papel en la liberación del compuesto y el tiempo que tarda en entrar en la fase acuosa), la forma química del compuesto de interés (determina su solubilidad en las diferentes fases), la estructura y cantidad de compuestos co-ingridos (los flavonoides están típicamente asociados con la fracción proteica y, por lo tanto, no están disponibles hasta que la proteína sea digerida), y en factores endógenos como velocidad de vaciamiento gástrico, tiempo de tránsito en el intestino, metabolismo y extensión de los procesos de biotransformación o unión a proteínas en el sistema circulatorio y tejidos. En su conjunto, estos factores pueden causar grandes variaciones inter- e intra-individuales en la biodisponibilidad, algunas veces en todo el intervalo de 0% a 100% de la dosis ingerida.

Desde que por definición un alimento es no tóxico en los niveles que normalmente es consumido, se asume que los polifenoles a las dosis que son ingeridos en los alimentos tampoco son tóxicos. En realidad, se trata de compuestos xenobióticos que son tratados por el cuerpo de la misma manera que cualquier otro agente no fisiológico. Su aparente seguridad natural puede reflejar más sus bajas concentraciones en los alimentos que su seguridad intrínseca. Igualmente importante es determinar cómo y cuánta exposición al flavonoide es necesaria para ejercer efectos favorables sobre la salud. Por lo tanto, al igual que otros xenobióticos, para evaluar el riesgo potencial y beneficios para la salud humana, es crucial disponer de un conocimiento claro del comportamiento fisiológico de estos compuestos tras su ingesta y particularmente de su metabolismo y biodisponibilidad.

En el organismo humano los flavonoides son, en general, pobremente absorbidos como tales en el tracto gastro-intestinal. En la mayoría de los casos, sólo una pequeña parte de los compuestos va a ser absorbida en el intestino delgado. La absorción intestinal de la mayoría de flavonoides es por difusión pasiva no iónica. Para ello, los flavonoides glicósidos, de naturaleza sustancialmente hidrofílica, deben ser previamente hidrolizados para liberar el aglicón, más lipofílico, que sería la forma transportada. En general, todos los flavonoides (excepto los flavanoles) se encuentran glicosilados o glucosilados en los alimentos, influenciando este hecho su limitada absorción. Probablemente la mayoría de los glicósidos resisten la hidrólisis ácida en el estómago, pudiendo llegar intactos al duodeno. En el intestino delgado solamente se absorben los aglicones y algunos glicósidos.

La mayoría de polifenoles O-glucósidos pueden ser hidrolizados por enzimas del tracto gastrointestinal o por la microflora para liberar su respectivo aglicón antes de ser absorbidos. Los aglicones y sus metabolitos son más hidrofóbicos, y por tanto más eficientemente transportados a través de la pared del tracto gastrointestinal que sus correspondientes glucósidos. Los flavonoides son sustrato para β -glucosidasa, UDP-glucuronosiltransferasa, y sulfotransferasa, así como para un número de enzimas de la fase I y II del metabolismo. La lactasa-florizina hidrolasa (LPH), una β -glucosidasa de la membrana localizada en los bordes ciliares del intestino delgado que es principalmente responsable de la hidrólisis de la lactosa, es capaz de separar los restos glicósidos en algunos tipos de flavonoides, estando su eficacia en este sentido determinada por el tipo de azúcar y su posición de unión en el flavonoide. Así, por ejemplo, los polifenoles que poseen una unidad ramnosa no son hidrolizados por enzimas del intestino delgado y alcanzan el colon donde son hidrolizados por ramosidasas de la microflora intestinal antes de ser absorbidos. Cuando interviene la flora intestinal se reduce la eficiencia de la absorción, a menudo porque la flora también degrada los aglicones produciendo varios ácidos aromáticos simples en el proceso. Algunos glicósidos de flavonoides pueden también entrar en el enterocito por transporte activo a través de transportadores de membrana, como el transportador glucosa dependiente de Na (SGLT⁺).

Tras su absorción, los aglicones son conjugados ya en el enterocito y más tarde en el hígado. Este proceso mayoritariamente incluye metilación, sulfatación y glucuronidación. Se trata de un proceso de detoxificación metabólica común a muchos xenobióticos que restringe los potenciales efectos tóxicos y facilita su eliminación biliar y urinaria por aumento de su hidrofilia. Los polifenoles y sus derivados son eliminados principalmente en orina y bilis. Son secretados por vía biliar hasta el duodeno, donde son susceptibles de la acción de enzimas bacterianas, especialmente β -glucuronidasa, en los segmentos distales del intestino, tras lo cual pueden ser reabsorbidos (circulación enterohepática).

Sobre el metabolismo de flavonoides en *C. elegans* se sabe muy poco, pero la red del metabolismo intermedio está bien conservada entre los eucariotas y la mayoría de rutas metabólicas encontradas en organismos heterotróficos están también presentes en *C. elegans* (Vastrik *et al.*, 2007). No obstante, debe tenerse en cuenta que el gusano carece de hígado, lo que introduce una notable diferencia con relación a los procesos metabólicos que se producen en el organismo mamífero.

2. 2. CAENORHABDITIS elegans

2. 2. 1. CARACTERÍSTICAS

(Hope, 1999; Horvitz, 2004),

Caenorhabditis elegans (Figura II.10), antiguamente llamado *Rhabditis elegans*, es un nematodo redondo, no parásito, de vida libre, que vive normalmente en el suelo, en todo el intervalo de temperatura de las regiones del mundo, alimentado de microorganismos como bacterias (p.ej., *E. coli*) y hongos. Como únicos requerimientos para su cultivo y reproducción precisa de un ambiente húmedo, temperatura ambiental entre 10 °C y 25 °C, oxígeno atmosférico y bacterias como alimento.

Es hermafrodita autofertilizante, lo que hace posible cultivarlo en el laboratorio en grandes cantidades, tanto en medio líquido como en placas petri, y propagar rápidamente diversas formas mutantes de una manera fácil y barata. Los adultos tienen solamente alrededor de 1 mm de longitud y 70 µm de diámetro, y, por lo tanto, sólo requieren un pequeño espacio para su mantenimiento. Sus movimientos están restringidos a suaves ondas sinusoidales, casi enteramente en un simple plano dorsoventral. No emiten olor intenso y su apariencia transparente es bastante atractiva y facilita su manipulación y observación. Un microscopio confocal es suficiente para un manejo rutinario. No obstante, la rapidez de crecimiento y capacidad de autofertilización exigen medidas especiales para estabilizar un cultivo sincronizado.

El tamaño del genoma de *C. elegans* es de 97 millones de pares de bases, unas 20 veces más grande que el de *E. coli* y aproximadamente un 1/30 del humano. Fue el primer organismo multicelular para el que fue completamente secuenciado su genoma, en 1998.



Figura II.10. *C. elegans* adulto (se observan huevos y fases larvarias).

2.2.2. SEXO

(Lewis y Fleming, 1995; Hope, 1999)

Existen dos formas sexuales, macho y hermafrodita, siendo esta última la predominante. Los hermafroditas producen esperma y ovocitos y pueden reproducirse por autofertilización, sin apareamiento. El macho produce solo esperma y para reproducirse debe aparearse con un hermafrodita. Después del apareamiento, el esperma del macho compite con el propio esperma del hermafrodita en la fertilización de los ovocitos y la mayoría de la progenie es luego resultado de la fertilización cruzada. Los huevos fertilizados son llevados y desarrollados internamente durante varias horas, el periodo exacto aumenta con la edad del hermafrodita. Un hermafrodita simple produce aproximadamente una progenie de 300 individuos hermafroditas (en nuestra experiencia, unos 240) por autofertilización, mientras que la fertilización cruzada puede producir más de 1000 gusanos machos y hermafroditas en proporciones iguales. La autofertilización conduce a homocigocidad de alelos, por lo tanto gusanos individuales que pueden considerarse genéticamente idénticos.

2. 2. 3. ANATOMÍA

(Donald, 1997; Hope, 1999; Sulston, 1983, 2004; Horvitz, 2004)

Ambos sexos tienen la misma anatomía general y son de tamaño similar, con el macho adulto ligeramente más pequeño y delgado que el hermafrodita. La boca está en la punta de la cabeza, mientras que el ano del hermafrodita y la cloaca del macho son ventrales en el extremo posterior. En contraste a la simple punta de la cola del hermafrodita, la cola del macho es una estructura elaborada con musculatura compleja y nervios asociados necesarios para el apareamiento. La distinción entre ambos sexos se realiza en base a las diferencias en la cola (Figura II.11).

Hermafrodita

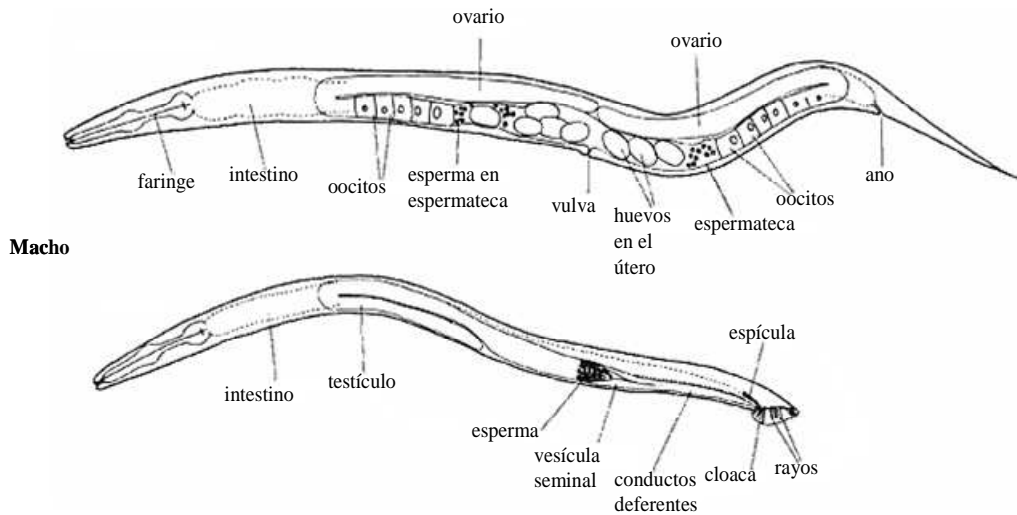


Figura II.11. Larva de *C. elegans* adulto (http://www.ciml.univ-mrs.fr/EWBANK_jonathan/Images/CeDiag.gif).

El sistema digestivo consta de una faringe y un intestino, que se extiende desde la cabeza hasta la cola y se observa sin dificultad al microscopio por la transparencia del animal. La faringe está compuesta de 20 células musculares, 20 células nerviosas y 18 células epiteliales y está encerrada en una membrana base. A través de contracciones musculares coordinadas, la faringe es la responsable de la ingestión de bacterias, cruzando la bacteria el molino en el bulbo terminal y pasando el alimento al intestino a través de la válvula faríngeo-intestinal. El intestino es un tubo grueso de estructura aparentemente sencilla, con 20 células simples organizadas en 9 anillos.

La pared del cuerpo está separada del intestino por el pseudocolon y presenta una parte exterior uniforme, una gruesa hipodermis de células simples que recubre la

mayoría de la pared del cuerpo y secreta la cutícula de colágeno, la cual cubre la superficie del gusano. Bajo la epidermis, mononucleada, las células musculares de la pared del cuerpo tienen una forma romboide y están organizadas en 4 bandas longitudinales; cada banda tiene 2 células anchas. Existen 24 músculos celulares en cada banda, salvo la banda ventral izquierda que tiene 23. La contracción coordinada del bloque de músculos subventrales contra los bloques de músculos subdorsales genera las ondas que permiten el desplazamiento del gusano. En la región de la cabeza son posibles movimientos ligeramente más elaborados, para la conducta alimentaria, y también en la región de cola del macho para el apareamiento.

Las células nerviosas están concentradas en el anillo nervioso circunfaríngeo, el cordón nervioso ventral y la cola, con células sensoriales en la cabeza. El sistema nervioso coordina el comportamiento rutinario y responde a estímulos medioambientales. *C. elegans* es sensible a la temperatura y a una variedad de estímulos mecánicos, agresores químicos y repelentes. La existencia de un sistema nervioso simple fue uno de los criterios principales para su elección como organismo modelo.

Los sexos, como se ha señalado anteriormente, difieren fundamentalmente en la disposición de la gónada y en la cola, estas diferencias se establecen predominantemente durante el desarrollo post embrionario. La gónada en ambos sexos es una simple estructura tubular en la cual la 'línea germinal' se replica a través de división nuclear sin un sincitio. En los machos, la gónada es un tubo simple abierto a la cloaca, cerca de la cola. En los hermafroditas la gónada tiene 2 lóbulos simétricos (uno se extiende hacia la parte anterior y el otro hacia la parte posterior) con abertura simple en el útero, localizado medio ventralmente en la vulva. La 'línea germinal' está encerrada en una membrana, y la maduración, con formación de células germinales individuales, se produce con el paso por el tubo hacia la abertura exterior. Las células espermáticas de *C. elegans* son ameboideas, parecidas a las de otros nematodos, y no tienen la morfología flagelada más típicamente asociada con células espermáticas. La fertilización ocurre en la espermateca entre el oviducto y el útero. Los hermafroditas, además, tienen un grupo de células musculares uterinas y vulvares responsables de la postura de los huevos.

Existen otras pocas estructuras anatómicas menores, como el sistema excretor/secretor responsable de la osmorregulación, que consta de una célula ducto-excretora, célula poro-excretora, glándula celular secretora y célula excretora. Las tres primeras células y el cuerpo de la célula excretora se localizan en la pared del cuerpo,

cerca del poro excretor que constituye una abertura en la superficie ventral hacia la región posterior de la cabeza.

2. 2. 4. CROMOSOMAS

(Wood, 1988; Donald, 1997)

C. elegans tiene 5 pares de autosomas (I, II, III, IV, V) y uno o dos cromosomas sexuales, X. Si el sexto par cromosómico es XX, *C. elegans* será hermafrodita. Una combinación XO (solamente un cromosoma en vez de un par) producirá un macho. En la naturaleza el hermafrodita es el sexo más común. Cuando el hermafrodita se aparea con machos, el 50 % de la progenie serán machos y el 50% hermafroditas. En el laboratorio, la autofertilización de hermafroditas o bien el cruce con machos puede ser manipulado para producir progenie con genotipos deseados, que son especialmente útiles para estudios genéticos.

2.2.5. CICLO DE VIDA

Una de las ventajas de *C. elegans* es que tiene un corto ciclo de vida (Figura II.12). Desde huevo a adulto, capaz de producir más huevos, transcurren 3,5 días a 20 °C, con un intervalo que oscila entre 2,5 días a 25 °C hasta 6 días a 15 °C. La puesta de huevos se produce a lo largo de un periodo de 4 días y cesa alrededor de los 5 días. El promedio de vida varía de 9 días (25,5 °C) a 35 días (10 °C), con una vida media a 20 °C entre 11 y 17 días (Gems y Riddle, 2000). Se ha observado que reduciendo la concentración de bacterias, restricción dietética, se puede elevar el promedio de vida de 16 a 26 días (20 °C), a la vez que se reduce el periodo de fecundidad y el tamaño de la camada hasta incluso niveles del orden 60 individuos (Klass, 2000).

Tras la embriogénesis (periodo desde la fertilización a la nidada) se genera el primer estadio larvario (L1), con una estructura general similar al adulto, aunque más pequeño (250 µm de longitud). El desarrollo post-embionario implica el crecimiento a través de 4 estados larvarios (L1 a L4) antes de que la muda final produzca el adulto. A 20 °C la embriogénesis dura 14 h, y los estados larvarios, señalados por sucesivas mudas, aparecen a las 29, 38, 47 y 59 h post-fertilización, respectivamente (Wood, 1988; Donald, 1997). Se debe considerar que pequeñas variaciones en la temperatura pueden acelerar o retrasar notablemente el desarrollo.

La concurrencia de ausencia de alimento y una densidad poblacional suficientemente alta a temperatura de 20 °C conduce a un estado alternativo, denominado *dauer*, formado en la segunda muda, que es morfológicamente distinto

de la larva desarrollada en buenas condiciones. Su orificio oral está cerrado por un tapón interno y su faringe está estrangulada y no realiza bombeo. Su cutícula específica y la falta de bombeo le confieren resistencia frente a muchas agresiones medioambientales; el gusano en estado *dauer* está especializado para sobrevivir en condiciones adversas, como desecación. Bajo el microscopio de disección la forma *dauer* aparece más delgada que una larva L3, pero con movimientos más rápidos que ésta cuando es estimulada mecánicamente. La forma *dauer* puede permanecer viable varios meses y cuando el alimento comienza a estar disponible, muda para llegar a larva normal L4 (Hope, 1999; Hu *et al.*, 2008).

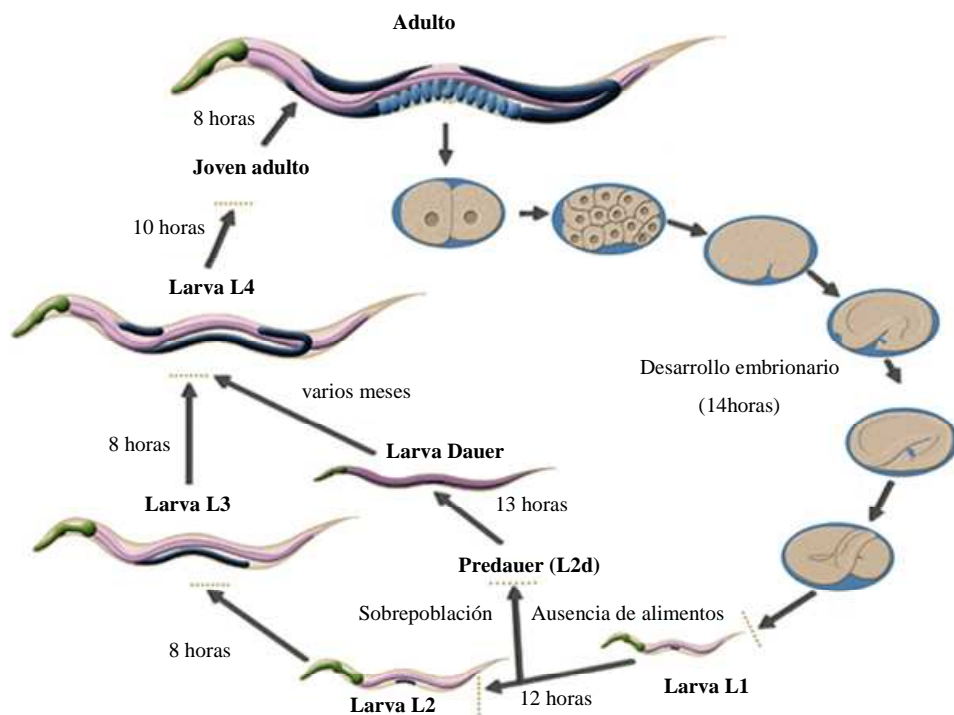


Figura II.12. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C (Fuente: www.wormatlas.org/).

2. 2. 6. DESARROLLO

(Sulston, 1983; Hope, 1999)

El gusano hermafrodita adulto posee 959 núcleos de células somáticas, 302 de las cuales son nerviosas. El número de células somáticas es algo menor que el de los núcleos, ya que algunas células son multinucleadas (p.ej., sincitios). El gusano masculino adulto, por su parte, posee 1031 células y cuenta con 79 células nerviosas extra con relación al hermafrodita, pudiendo estar la diferencia en el sistema nervioso entre ambos sexos relacionada con el comportamiento sexual. Además, hay de 1000 a 2000 células germinales.

El patrón de divisiones celulares a partir del huevo fecundado es casi siempre el mismo. La consistencia en el desarrollo, sumada a la completa transparencia del animal en todos los estados de desarrollo y el relativamente pequeño número de células que componen la totalidad de la forma del individuo, han hecho posible la descripción completa del desarrollo del linaje celular de *C. elegans*. Esta descripción incluye el tiempo y orientación de cada división celular mitótica así como el origen y destino de cada célula creada.

El gusano adulto se crea a partir de aproximadamente 10 ciclos de divisiones celulares, o menos. Existen 2 fases en la embriogénesis. Durante las primeras 6 horas las primeras divisiones mitóticas celulares (558 en la hermafrodita y 560 en el macho) producen 6 células fundadoras diferentes con un destino separado, a partir de las cuales derivan todos los tejidos de *C. elegans*. La división inicial es asimétrica y da origen al linaje P1 y a la célula fundadora AB; las divisiones posteriores en el linaje P dan lugar a las otras cinco células fundadoras: E, MS, C, D, y P4, esta última correspondiente a la línea germinal.

En la segunda fase de la embriogénesis, la morfogénesis convierte el ovoide de células en la forma larvaria. La diferenciación celular ocurre durante el periodo de elongación embrionario, y a medida que las células musculares y nerviosas se diferencian, el embrión empieza a torcerse primero y luego a enrollarse dentro de los confines del huevo hasta producir la aparentemente forma completa L1. A excepción de las células intestinales y de las gónadas, que se originan a partir de una sola célula fundadora en cada caso (E y P4, respectivamente), las restantes células diferenciadas derivan de más de una célula fundadora.

2. 2. 7. CAENORHABDITIS elegans COMO ORGANISMO MODELO EN ESTUDIOS BIOLÓGICOS

En los últimos años, diversos grupos de investigación han comenzado a utilizar el nematodo *C. elegans* como organismo modelo para desarrollar estudios *in vivo* con distintos fitoquímicos. Como ya se ha visto, se trata de un modelo con múltiples posibilidades, que ofrece una serie de ventajas respecto a otros modelos animales. Es el animal multicelular mejor caracterizado a nivel genómico, embriológico, neurobiológico y celular. Su fácil manejo, su bajo coste y su ciclo de vida corto permiten la rapidez y facilidad de trabajo de un microorganismo, pero con las ventajas de un modelo animal real. Además, *C. elegans* tiene un sistema de órganos completo, incluyendo sistema sensorial, y las casi 1000 células que lo componen mantienen una posición conocida y constante. Este modelo animal fue el primero de los eucariotas

multicelulares para los que se ha secuenciado completamente el genoma, que se encuentra organizado en 6 cromosomas cuya anotación representa aproximadamente unos 20.000 genes. Se dispone además de una librería de clones bacterianos que expresan dsRNAi (ácido ribonucleico interferencia de doble cadena) para casi la totalidad de los genes y de una amplia colección de mutantes. La morfología, desarrollo y función de cada una de sus células ha sido mapeada con gran detalle. Se ha demostrado que existe una gran conservación entre *C. elegans* y los mamíferos tanto a nivel celular como molecular y se ha confirmado que existen más de un 40% de genes ortólogos entre este gusano y los humanos. El entendimiento de la biología del *C. elegans* depende de la identificación y análisis de genes esenciales. Un gen esencial está definido aquí como un gen necesario para desarrollar a un adulto fértil. Algunos genes esenciales fueron identificados fortuitamente, pero la mayoría de genes esenciales son identificados a través de investigación de mutantes designados específicamente para aislar mutaciones letales o estériles. Basado en la frecuencia de mutaciones letales del cromosoma X, Brenner (Kemphues, 2005) estimó que el genoma del *C. elegans* tenía cerca de 2000 genes esenciales. La inclusión de mutaciones estériles elevaron esta estimación a cerca de 3000, y un número de proyecciones para mutaciones letales y estériles en regiones genómicas específicas en los años 80 produjo frecuencias de genes del orden de 5700 (análisis estadísticos alternativos elevan el estimado a cerca de 8500) (Kemphues, 2005).

En definitiva, el número estimado de genes esenciales en *C. elegans* parece ser al menos el 30% del genoma. La redundancia genética puede enmascarar un significativo número de funciones esenciales, pero la construcción de mutantes dobles y triples representa un potencial para identificar muchos de estos casos. El Centro Genético de *C. elegans* (www.cbs.umn.edu/CGC) almacena y distribuye todas las cepas mutantes que tienden a ser generadas en el gusano (12571 hasta junio 2010) (Kemphues, 2005; Van Raamsdonk and Hekimi, 2010).

C. elegans ha sido especialmente examinado en relación con las cascadas de señalización de insulina, cuya inactivación ('knock-out') confiere una mayor duración de vida en los gusanos promoviendo el estado *dauer*. La acumulación de grasa y la alteración del metabolismo son características de las formas *dauer* longevas y con mayor resistencia al estrés. En general, estos cambios son predecesores de los ajustes metabólicos encaminados a favorecer la conservación y eficiencia energética que tienen lugar en mamíferos sometidos a restricción calórica. Por ello, *C. elegans* constituye un buen modelo para estudios relacionados con estrés oxidativo, metabolismo calórico y longevidad, particularmente útil en estudios sobre envejecimiento. Hay que tener en cuenta que algunos aspectos del envejecimiento

son similares entre nematodos y mamíferos, incluido el hombre. Por ejemplo, el estrés oxidativo es uno de los principales factores implicados en el envejecimiento en ambos y la restricción calórica se muestra como un factor que permite alargar la duración de vida tanto en *C. elegans* como en algunos sistemas mamíferos.

La red del metabolismo intermedio está bien conservada entre los eucariotas y la mayoría de rutas metabólicas encontradas en organismos heterotróficos están también presentes en *C. elegans* (Vastrik *et al.*, 2007). Las bases de datos, como Wormbase, Reactome y KEGG, muestran que existen ortólogos en *C. elegans* para la mayoría de las enzimas involucradas en las principales rutas del metabolismo intermedio.

Bajo condiciones aeróbicas, *C. elegans* obtiene energía a través de las rutas metabólicas estándar, como la glicólisis. A través de una serie de reacciones enzimáticas, los azúcares (típicamente glucosa) son convertidos a piruvato, que es translocado a la mitocondria, descarboxilado y convertido en acetil-CoA, entrando en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, con formación CO_2 , GTP y/o ATP, y de formas reducidas de los portadores de electrones, NAD^+ y FAD^+ . Los lípidos y aminoácidos pueden también ser usados como fuentes de energía, entrando a las principales rutas en diferentes puntos. Los ácidos grasos son degradados por β -oxidación en acetil-CoA, que puede entrar en el ciclo de TCA y produce también portadores de electrón reducidos. Los aminoácidos son degradados por distintas rutas y sus esqueletos de carbono posteriormente metabolizados en el ciclo de TCA. *C. elegans* posee también una metilmalonil-CoA epimerasa (racemasa) que está involucrada en el metabolismo de propionil-CoA para la degradación de aminoácidos ramificados y de ácidos grasos de cadena impar (Kühnl *et al.*, 2005). Además de la rutas convencionales de metabolismo intermedio, *C. elegans* también pueden usar rutas alternativas dependiendo de los distintos niveles de desarrollo en condiciones ambientales.

2. 2. 8. CAENORHABDITIS *elegans* Y FLAVONOIDES

En la actualidad existe un creciente interés particular en el conocimiento de las actividades y mecanismos de acción de los compuestos fenólicos, y en especial de los flavonoides. Según nuestro conocimiento, los estudios llevados a cabo con este fin en el modelo *C. elegans* son escasos, y se relacionan básicamente con la influencia de flavonoles y flavan-3-oles sobre longevidad y resistencia al estrés oxidativo, aunque generalmente sin profundizar en los mecanismos moleculares. Los estudios encontrados en bibliografía se resumen a continuación.

Estudios con extracto de Ginkgo biloba EGb 761.

- Wu *et al.* (2002), evaluaron los efectos farmacológicos del extracto EGb 761 de *G. biloba* (100 µg/mL) en *C. elegans*, encontrando que aumentaba la resistencia al estrés y la longevidad. Entre los varios componentes purificados de este extracto, el flavonoide tamarixetina (4'-metilquercetina)(50 µg/mL 22 °C) era el que mostraba los efectos más acusados, produciendo una extensión en la vida media del 25%; sin embargo los flavonoides quercetina y kaempferol no influenciaba la vida media. Además, el extracto aumentaba la resistencia de gusanos del tipo silvestre al estrés oxidativo (juglona 40 µM) y térmico (35 °C) agudos en un 33% y 25%, respectivamente, así como incremento en la vida media de 8%.
- Kampkötter *et al.* (2006) observaron en ensayos con un extracto de *Ginkgo biloba* (EGb 761) a una concentración de 100 µg/mL (en medio líquido a 20 °C) que producía, en condiciones de estrés térmico, una prolongación en la vida media y máxima de *C. elegans* de 12% y 19%, respectivamente, así como una reducción en el tamaño del cuerpo de 17% pero ninguna influencia sobre la reproducción. El extracto ensayado atenuaba la acumulación de ROS en el gusano, tanto bajo condiciones de cultivo normales como expuesto a estrés oxidativo intracelular, promovido por juglona 20 µM, y a estrés térmico (37 °C). Se observó que el tratamiento con el extracto conducía a una disminución en la transcripción de los genes catalasa inducible por estrés, así como de la expresión de la glutatión S-transferasa 4 productora de estrés.

Estos dos estudios mostraban una concordancia a pesar de las condiciones de ensayos diferentes, en los resultados obtenidos sobre los efectos del extracto de *Ginkgo biloba* sobre extensión de la vida media y protección al estrés del nematodo,

Estudios con extractos de polifenoles obtenidos de frutas.

- Wilson *et al.* (2006), examinaron los efectos de diferentes fracciones de polifenoles de arándano sobre la vida y el envejecimiento en *C. elegans*. Determinaron que sólo la fracción enriquecida en proantocianidinas (65 µg/mL) era capaz de aumentar la vida y la termotolerancia en el gusano. Este extracto extendía la vida media en un 28% y la máxima en 14%, siendo el efecto dependiente de la temperatura, observándose en animales cultivados a 25 °C o 20 °C pero no a 15° C. El tratamiento también aumentaba la termotolerancia a 35 °C, pero no mejoraba la supervivencia bajo estrés oxidativo severo producido por peróxido de hidrógeno o paraquat.
- Sunagawa *et al.* (2011), investigaron los efectos de fracciones de extracto de manzanas sobre longevidad de *C. elegans*. El tratamiento con 65 µg/mL de

procianidinas (PC) a 20 °C, extendió el promedio de vida de los gusanos de cepas silvestres N2 y de mutantes *fem-1* en 12,1% y 8,4%, respectivamente, efecto similar al de resveratrol. Además, el tratamiento con 100 µg/mL de polifenoles de manzana también prolongó el promedio de vida de los mismos gusanos en un 12,0% y 5,3%, respectivamente. Sin embargo, epicatequina y una mezcla de monómeros no afectó la vida media. El tratamiento con PC no prolongó la vida de los mutantes *mev-1* ni la longevidad de los *sir-2.1*. En ningún caso las PC influían en el crecimiento, ingesta de alimento, ni fecundidad de *C. elegans*.

En ambos estudios, las fracciones de frutas conteniendo proantocianina fueron los que presentaron efectos más acusados sobre la longevidad y la termotolerancia, siendo más activos los extractos de arándano de acuerdo a su mayor contenido de estos compuestos.

Estudios con quercetina y compuestos relacionados.

- Kampkötter *et al.* (2007), examinaron los efectos de los flavonoides kaempferol y fisetina (100 µM), encontrando que ambos elevaban la supervivencia de *C. elegans*, con un aumento en la vida media de aproximadamente el 10% y el 6%, respectivamente. Ambos flavonoides reducían la acumulación intracelular de ROS asociada a estrés térmico, siendo esta reducción significativamente mayor para kaempferol que para fisetina. El kaempferol también atenuaba la acumulación del marcador del envejecimiento lipofusina en un 25%, mientras que este efecto no era significativo en presencia de fisetina. Ambos flavonoides causaban una translocación de DAF-16 desde el citosol al núcleo indicando que afectaban a procesos de señalización regulados por la actividad de ese factor.
- Kampkötter *et al.* (2007), observaron que quercetina y su glicósido, rutina (100 µM 20 °C) en medio líquido reducían la acumulación de ROS asociada a estrés térmico (37 °C), siendo los efectos mucho más acusados en el caso de quercetina en un 50%. Esta última también prolongaba la vida media del gusano aproximadamente en un 12%. Sin embargo, el tratamiento con rutina no tenía efecto sobre la longevidad. La distribución subcelular del factor de transcripción FoxO DAF-16 era solamente afectado por la quercetina indicando un efecto modulador de ésta en la cascada de señalización. Estos autores (Kampkötter *et al.*, 2008) encontraron posteriormente que la quercetina mejoraba un 15% la resistencia a estrés oxidativo y prolongaba la vida media y el máximo de vida en *C. elegans* en un, 19% y 15%, respectivamente. La quercetina se comportaba como un potente agente antiradicalario

reduciendo la necesidad de la enzima antioxidante magnesio superóxido dismutasa mitocondrial SOD-3 para el mantenimiento de la homeostasis redox celular. Al igual que en el trabajo anterior, los autores confirmaron que el tratamiento con quercetina afectaba la distribución subcelular de DAF-16 causando una translocación parcial del factor de transcripción FoxO DAF-16 al interior del núcleo, un estado frecuentemente asociado con la respuesta al estrés y la longevidad. Estos resultados sugerían que los efectos de quercetina no estaban mediados solamente por su capacidad antioxidante sino también por modulación de las rutas de señalización.

- Pietsch *et al.* (2009), realizaron un estudio sobre la influencia del flavonoide quercetina sobre la vida en *C. elegans*. El tratamiento con quercetina prolongaba la vida entre un 11 y 18% en presencia de 100 y 200 μM de quercetina 20 °C respectivamente. Asimismo, el tratamiento con quercetina no mostraba efecto sobre la reproducción y longitud del cuerpo a las diferentes concentraciones estudiadas. además, ni una restricción calórica mimética ni una dependencia sirtuin (*sir-2.1*) fue identificada como probable mecanismo de acción.
- Xue *et al.*, 2011 aislaron tres compuestos quercetina, quercetina 3'-O-glucosa y quercetina 3-O-glucosa (4→1) glucosa de cebolla, sus actividades antioxidantes fueron determinada por el método DPPH y su actividad sobre la longevidad fueron determinadas en el *C. elegans* encontrando un incremento en la vida media de 14, 12 y 20% respectivamente a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ 20 °C. Aunque la quercetina mostró la mayor actividad antioxidante era quercetina 3-O-glucosa (4→1) glucosa con el que se obtuvo un mayor incremento de la vida media.

Se puede sugerir por lo antes citado que el efecto de los flavonoles sobre la vida media y la protección frente al estrés es dependiente del compuesto y su concentración ensayada, y que estos pueden actuar vía diferentes mecanismos de acción.

Estudios con catequinas.

- Brown *et al.* (2006), demostraron que concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μM (20 °C) de EGCG y ácido α -lipoico eran capaces de reducir los niveles de peróxido de hidrógeno en *C. elegans* tratados desde L1 de manera dosis-dependiente. Sin embargo, este efecto no era, observado en los gusanos de mayor edad (5 días adultos). El ácido α -lipoico, pero no EGCG, extendía la vida media y máxima en el gusano tipo silvestre pero no en mutantes *daf-16*,

sugiriendo que este efecto puede ser dependiente de la ruta de señalización de la insulina/IGF-1. Por su parte, EGCG disminuía moderadamente la parálisis producida por el péptido β -amiloide en *C. elegans* transgénicos, lo que confirmaba lo observado en estudios *in vitro* que mostraban que esta catequina era capaz de atenuar la toxicidad inducida por el péptido en cultivos de neuronas del hipocampo.

- Zhang *et al.* (2009), no encontraron que EGCG prolongara la vida media de *C. elegans* en condiciones normales de cultivo a 20 °C o 25 °C. Sí observaron, sin embargo, que era capaz de mejorar la resistencia frente a estrés térmico (35 °C) y estrés oxidativo, observándose un aumento entre un 13% y 177% respectivamente. Estos resultados fueron justificados por la captación de radicales libres por el compuesto y posiblemente por sus efectos sobre la regulación en proteínas relacionadas a resistencia al estrés, incluyendo superóxido dismutasa 3 (SOD-3) y proteína de shock térmico (HSP-16,2). Los resultados obtenidos mostraron que EGCG a una concentración de 0.1 μ g/mL era capaz de inhibir significativamente la producción de ROS tanto en condiciones normales como bajo condiciones de estrés oxidativo producido por juglona (300 μ M).
- Abbas y Wink (2009), observaron que la epigallocatequina 3-O-galato (EGCG) aumentaba la resistencia al estrés y la vida media de *C. elegans* N2 y cepas transgénicas (*hsp-16,2/GFP*, *mev-1*, *fem-1*). La expresión de *hsp-16,2* fue suprimido en 26,7% y los niveles intracelular de H_2O_2 fueron inhibidos en un 32,6% por el tratamiento con EGCG (220 μ M), un incremento en la vida media de 10,1 y 14,3 % para N2 y *fem-1* fue determinado, así como un incremento en la tasa de supervivencia de 65% frente al estrés oxidativo letal. Estos mismo autores, (2010) investigaron el mecanismo de acción. La expresión de *hsp-16,1* y *hsp-16,2* en gusanos tratados con 220 μ M de EGCG era significativamente menor bajo las condiciones de estrés oxidativo inducido por juglona (20 μ M) en presencia de EGCG que en controles sin EGCG. En la variedad TJ356 (DAF-16:GFP) el tratamiento con EGCG inducía la translocación de DAF-16 desde el citoplasma al núcleo, sugiriendo que podía afectar el *daf-2* y la vía de señalización insulina/IGF-1. EGCG también disminuía la formación de lipofuscina, un pigmento relacionado con el envejecimiento.
- Saul *et al.* (2009), estudiaron la longevidad de *C. elegans* en presencia de tres concentraciones de catequina, 100, 200, 300 μ M, encontrando que el mayor efecto se producía para 200 μ M (20 °C) con un aumento en la vida media de 25%. Igualmente, mejoraba la resistencia al estrés oxidativo entre un 9 y 28%, y

la termotolerancia (35 °C) entre un 4 y 15%, sin una marcada alteración del comportamiento reproductivo. En este caso no se encontró que las cascadas de señalización de insulina/IGF-1 y la calmodulin kinasa II jugaran papel mecanístico relevante. Ensayos con varias cepas mutantes revelaron que no se producía un aumento en la vida media en fenotipos *mev-1*, *daf-2*, *akt-2* and *nhr-8*. En este trabajo también se observó que la catequina reducía la longitud del cuerpo, lo que se interpretó como una consecuencia de la influencia ejercida al modular la intensidad de la energía en respuesta al estrés y sistemas de reparación de acuerdo a la teoría del Soma disponible.

El caso de EGCG una de las principales catequinas de la dieta, los estudios presentaban resultados contradictorios en la extensión de la vida media en *C. elegans*, sin embargo todos coinciden en la protección que brinda frente al estrés oxidativo y térmico, sugiriendo como uno de los posibles mecanismos implicados la ruta de señalización de la insulina.

Otros compuestos.

- Kawasaki *et al.* (2010), encontraron que el tratamiento con 1 mM de apigenina en 1% de DMSO producía una inhibición en el crecimiento de las larvas de *C. elegans*, siendo el retraso más prominente en la generación F2. Se observó que el tratamiento de gusanos con apigenina indujo la localización nuclear del DAF-16 en 23% y se concluyó que la apigenina actuaba como un factor de estrés activando el DAF-16, lo que inhibía el crecimiento larvario.
- Martorell *et al.* (2010), observaron que un medio de cultivo suplementado con extracto de cacao (4 mg/mL) enriquecido con polifenoles (12% de polifenoles incluyendo catequina, epicatequina y procianidinas) conducía a un aumento en la resistencia al estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrogeno tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como en *C. elegans*. El tratamiento con este extracto de cacao prolongó la vida media del gusano de tipo silvestre en un 17%. Estos efectos eran dependientes de los compuestos fenólicos del cacao y sirtuinas sir-2.1. El factor de transcripción DAF-16 también jugaba un papel importante en el caso del nematodo, indicando que la vía de señalización insulina/IGF-1 estaba relacionada con el efecto antioxidante de los polifenoles.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.1. EQUIPOS

- Incubadoras refrigeradoras Velp modelo FTC 901.
- Autoclave Selecta modelo Presoclave II.
- Campana de flujo laminar Telstar modelo AV-30/70.
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453 acoplado a un ordenador HP LE 2001 con programa de procesamiento de datos Agilent ChemStation para espectroscopia UV-visible.
- Centrífuga Sorvall RC-5B (refrigerated superspeed centrifuge, Du pont Instruments).
- Concentrador rotatorio Genevac modelo Mivac DNA .
- Baño ultrasonido Branson modelo 5510.
- Lupa Leica M250 FA con cámara Leica DFC420C y software de aplicación V3.
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies) compuesto por bomba cuaternaria, inyector automático, sistema de termostatación de columnas y detector de diodos en circuito integrado, dotado de una celda de flujo para altas presiones, y acoplado a una estación de control y tratamiento de datos HP ChemStation (rev. A.05.04).
- Equipo de cromatografía líquida semipreparativa Waters 600 compuesto por bomba cuaternaria, inyector manual, detector UV-Visible acoplado a una estación de control Millenium.
- Liofilizador Telstar modelo LyoQuest.
- Espectrómetro de masas Applied Biosystems modelo API 3200 Qtrap, equipado con fuente de ionización por electrospray y analizador de masas triple cuadrupolo/trampa de iones lineal controlado por el software Analyst 5.1.
- Agitador Vortex IKA Genios 3.
- pHmetro Crisol Basic 20.
- Agitador magnético SBS.
- Baño María Bunsen.
- Rotavapores Büchi R-124, con baño de agua termostatizable B-480 y bombas de vacío B-270

- Sistema de producción de agua ultra pura Direct-Q™ 3 de Millipore, compuesto por un módulo de pretatamiento Progard™2 2, cartuchos de ósmosis inversa, cartucho Quantum™ Ex y filtros Millipack® 40 (22 µm).

3.1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

- Sigma Aldrich: ampicilina sódica, nistatina, colesterol, epicatequina, extracto de levadura, quercetina, catequina, agar, triptona, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (juglona), seroalbúmina bovina, reactivo de Bradford.
- Scharlau: dimetil sulfóxido de grado espectroscópico, ácido trifluoroacético.
- Merck: acetonitrilo, fosfato di-hidrógeno de potasio, sulfato de magnesio, hidróxido de sodio, fosfato mono-hidrógeno de potasio, fosfato mono-hidrógeno de sodio, Tween 20.
- VWR Prolabo: etanol, ácido fórmico, ácido acético.
- Extrasynthèse: quercetina-3-O-glucopiranosido, isorhamnetina, tamarixetina.
- Fluka Analytical: peptona de soja, medio Triptona.
- Panreac: cloruro de sodio, cloruro de calcio.
- Riedel-de Haën: Solución de hipoclorito de sodio 6-14 % Cl activo.

3.1.3. MATERIAL BIOLÓGICO

- Los gusanos *C. elegans* y las bacterias *Escherichia coli* OP50 utilizadas como fuente de alimento, fueron obtenidos del Caenorhabditis Genetic Center (CGC) de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, EEUU).

3.2. MÉTODOS GENERALES

3.2.1. PREPARACIÓN DE PLACAS PETRI NGM

Todos los ensayos fueron llevados a cabo usando la cepa silvestre N2.

Para la preparación del medio NGM (Nematode Growth Medium) se mezclaban 3 g de NaCl, 17 g de agar, 2,5 g de peptona en 975 mL de H₂O destilada. La mezcla se trataba en autoclave durante 50 min y, a continuación, se enfriaba en baño de agua a 55 °C durante 15 min. El medio NGM era enriquecido, en ese momento, con 1 mL de CaCl₂ 1M, 1 mL de colesterol (5 mg/mL etanol), 1 mL MgSO₄ 1M, 25 mL buffer KPO₄ 1M pH 6,0 (108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄ en 1L de H₂O), 1 mL de ampicilina sódica (50

µg/mL) y 1,75 mL de nistatina (4%), todo ello previamente esterilizado en autoclave. La solución NGM se transfería a las placas Petri bajo condiciones estériles, llenando las placas hasta aproximadamente 2/3. Una cantidad constante de agar en las placas reduce la necesidad de refocalizar el microscopio cuando se cambia de una placa a otra. Antes de utilizarse, las placas se dejaban enfriar a temperatura ambiente, en campana de flujo laminar, durante 2 o 3 días, para permitir la detección de contaminantes y la evaporación del exceso de humedad. Las placas así preparadas pueden ser mantenidas en refrigeración, entre 4 y 8 °C, durante varias semanas.

3.2.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE LAS BACTERIAS *ESCHERICHIA coli* Y SEMBRADO DE LAS PLACAS

Las bacterias se cultivaron en medio L. Broth, que contenía: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g NaCl en 1L de H₂O destilada. El pH era ajustado a pH 7,0 con NaOH 1M, y el medio de cultivo esterilizado en autoclave.

Las placas con medio NGM estéril, preparadas como se ha señalado anteriormente, se sembraban con las bacterias crecidas en el medio de cultivo. Se depositaban en la placas aproximadamente 50-100 µL del cultivo de *E. coli*, dependiendo del diámetro de la placa utilizada. Las bacterias se extendían con una varilla de vidrio, sin dañar la superficie del agar, para evitar que los gusanos se introdujeran en el interior del agar, lo que haría más difícil su posterior recogida. Los gusanos tienden a localizarse dentro de la capa bacteriana, por lo que si ésta se extiende a los bordes de la placa los gusanos pueden escaparse fuera de la placa y morir.

La siembra de una nueva placa con gusanos se hacía transfiriendo un trozo de agar con gusanos desde una placa vieja a una placa fresca con ayuda de un bisturí o una espátula esterilizados.

Para transferir gusanos individualmente se usaba un asa de siembra de alambre de platino de calibre 32. El final del alambre era aplanado y afinado con una lima para eliminar los filos del borde, ya que las partes puntiagudas podrían matar a los gusanos o dañar el agar. Antes de transferir los gusanos de una placa a otra, el asa de siembra se flameaba para evitar contaminación entre placas.

C. elegans es transparente por lo que puede ser visualizado usando un microscopio equipado con una fuente de luz blanca. El gusano que se quiere recoger se observa primero al microscopio, y a continuación lenta y cuidadosamente se coge con el asa.

3.2.3. SINCRONIZACION DE LOS GUSANOS

La sincronización de *C. elegans* se realiza con el objetivo de que todos los individuos que se van a utilizar para un determinado ensayo se encuentren en el mismo estado larvario, es decir tengan todos ellos la misma edad. Para ello se dejaba crecer durante varios días gusanos en las placas hasta obtener gran cantidad de huevos y/o hermafroditas con huevos en su interior. El proceso de sincronización se llevaba a cabo por medio de una solución de hipoclorito sódico, que destruye todas las larvas y carcasa de los gusanos adultos sin afectar a los huevos.

Para llevar a cabo la sincronización de los gusanos, se recogían en tubos de centrífuga huevos y gusanos en los distintos estados larvarios mediante lavado de las placas con tampón M9 (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl , 1 mL MgSO_4 1M, H_2O hasta 1 L, esterilizar por autoclavado), manteniendo el tubo en todo momento en un baño de hielo para evitar la eclosión de los huevos. Posteriormente se centrifugaba durante 5 min a 3000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se retiraba y sobre el residuo de gusanos y huevos se adicionaban 20 mL de una solución de hipoclorito sódico, preparada para cada uso al 12% a partir de una disolución concentrada comercial, agitando vigorosamente durante 10 min (alternando cada minuto un ciclo de agitación o un ciclo de reposo del tubo en hielo). Pasados los 10 min, la mezcla se centrifugaba durante 5 min a 3000 rpm y 4 °C y a continuación se eliminaba el sobrenadante. Este proceso era repetido una vez más con otros 20 mL de hipoclorito sódico.

Para eliminar del residuo de huevos sincronizados obtenido anteriormente, los posibles restos de hipoclorito, se procedía a realizar sucesivos lavados con 20 mL de tampón M9. Este proceso se repetía 4 veces. Para la obtención del cultivo sincronizado, el residuo final del proceso de sincronización se resuspendía en M9 y se incubaba a 20 °C durante 18-24 h para permitir el desarrollo de los huevos al estado larvario L1. El residuo resuspendido que contiene los gusanos en el estado larvario L1 se puede mantener a 15 °C para posteriores utilizaciones.

3.2.4. PREPARACIÓN DE PLACAS PARA LOS ENSAYOS CON FLAVONOIDES

Para los ensayos de cultivo de los gusanos en presencia de los distintos flavonoides (quercetina, isoramnetina, tamarixetina, quercetina-3-O-glucósido, catequina, epicatequina, 3'-metil-epicatequina y 4'-metilepicatequina) se prepararon placas de agar NGM que contenían cada uno de los compuestos. Para ello, se partía de una disolución madre de cada flavonoide (200 mM) en DMSO, de la cual se incorporaba un volumen adecuado al agar, previamente preparado y licuado por calentamiento ligero en horno microondas, para obtener una concentración final del

flavonoide de 200 μM . Las placas se sembraban con bacterias *E. coli* OP50 muertas por calentamiento a 65 °C durante 30 min. En el ensayo particular con quercetina-3-O-glucósido se prepararon placas con diferentes concentraciones del compuesto (10, 25, 50, 100, y 200 μM). En todos los casos las placas contenían un volumen final de 0,2% de DMSO en el medio de cultivo, incluyendo las placas control libres de flavonoides, en las cuales se incorporaba sólo el disolvente para mantener en el agar la misma composición que en los ensayos con flavonoides.

3.2.5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

3.2.5.1. Ensayos de reproducción

Los nematodos sincronizados en estado de larva L1 eran cultivados en placas con agar NGM con diámetro de 96 mm que contenían el compuesto con el que iban a ser pre-tratados los gusanos. Paralelamente se hacía un control en placas sin compuesto. Una vez que se alcanzaba el estado larvario L4 se hacía una transferencia a 10 placas de 35 mm de diámetro en cada una de las cuales se depositaba un gusano. Diariamente cada gusano era cambiado a placas nuevas, conteniendo siempre el compuesto de ensayo, hasta el final de su periodo reproductivo, al cabo del cual las placas con los huevos puestos por los gusanos se incubaban a 20 °C durante 2 días, para que los huevos eclosionaran y pasaran hasta el estado larvario L2 y L3, en que se contabilizaban las larvas; a la vez que se verificaba que los huevos eran fértiles. Estos ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

3.2.5.2. Efecto sobre la longitud del cuerpo

Gusanos sincronizados en estado de larva L1 eran transferidos a las placas de agar NGM/OP50 con los distintos tratamientos empleados, y cultivados a 20 °C durante 6 días, es decir hasta que el gusano adulto termina su periodo fértil. Para medir la longitud de los nematodos en este estado de desarrollo, se les aplicaba un tratamiento térmico a 42 °C durante 2 h para provocar la muerte de los gusanos. La longitud era determinada en aproximadamente 10 individuos por cada ensayo, a través de un microscopio Leica M205 FA equipado con una cámara (Leica DFC 420) y un software de procesamiento de datos Leica Application Suite V3, que dispone de una escala calibrada en milímetros. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado.

3.2.6. ENSAYOS DE ESTRÉS TÉRMICO

La vida de *C. elegans* es dependiente de la temperatura, existiendo una relación inversa entre la temperatura de cultivo y la vida media del gusano. La termotolerancia está en gran medida determinada por la síntesis de la proteína de shock térmico (Muñoz, 2003). Estos ensayos eran llevados a cabo según el método descrito por Saul *et al.* (2009) con pequeñas modificaciones, como se describe a continuación.

Los gusanos sincronizados en estado larvario L1 eran colocados en placas de 35 mm de diámetro que contenían los distintos flavonoides y cultivados a 20 °C. Simultáneamente se realizaban ensayos control en ausencia de los compuestos. La influencia del estrés térmico sobre la viabilidad del gusano se evaluaba en dos estados de desarrollo. En el primer ensayo, los nematodos permanecían en las placas con tratamiento hasta alcanzar el primer día de adulto joven, en el cual eran sometidos a 35 °C durante 8 h. En el segundo ensayo, los gusanos en estado larvario L1 permanecían en las placas de tratamiento y control hasta alcanzar el sexto día de adulto (un total de 9 días), es decir se dejaba que completaran todo su periodo reproductivo, antes de someterlos a estrés térmico (35 °C, 8h). En este segundo ensayo, desde el cuarto día los gusanos se transferían cada día a nuevas placas para evitar mezcla de generaciones.

Una vez sometidos a estrés térmico se contaban los nematodos supervivientes y los muertos. Se consideraba que los gusanos estaban muertos cuando no respondían a ningún estímulo, como ligeros toques con el asa de siembra. Estos ensayos se llevaron a cabo con 100 gusanos por tratamiento y por triplicado.

3.2.7. ENSAYOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

Estos ensayos se llevaron a cabo para determinar la respuesta de los gusanos tratados con los diferentes flavonoides frente al estrés oxidativo generado por juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona), pro-oxidante que puede ser reducido con NAD(P)H por diaforasas, convirtiendo el oxígeno a anión superóxido y como consecuencia aumentando el estrés oxidativo intracelular (de Castro *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009).

El ensayo era llevado a cabo según el método descrito por Kampkötter *et al.* (2008) ligeramente modificado, como se describe a continuación. Los gusanos sincronizados en estado larvario L1 eran transferidos a placas de 35 mm que contenían cada uno de los diferentes flavonoides a la concentración de 200 µM, y cultivados a 20 °C hasta que evolucionaban a adultos. Después del pretratamiento con los diferentes flavonoides, los gusanos adultos, aproximadamente 100 individuos por cada

tratamiento, eran transferidos a placas NGM que contenían juglona a una concentración de 150 μ M, donde se mantenían a 20 °C durante 24 h.

Para evaluar si las distintas etapas de desarrollo mostraban alguna influencia en la resistencia a estrés oxidativo inducido, este ensayo se llevó a cabo, al igual que en el de estrés térmico, en dos periodos de desarrollo. En el primer caso, los nematodos eran transferidos a las placas con juglona en el primer día de adulto. En el segundo ensayo, los gusanos eran sometidos a estrés oxidativo cuando se encontraban en su 6º día de adulto. Paralelamente, se realizaban ensayos control, sin flavonoides, en placas que contenían 0,2 % de DMSO.

La supervivencia de los gusanos era evaluada a las 8 h y después de 24 h de someter los nematodos adultos al estrés oxidativo. Se consideraba como gusanos vivos, que sobrevivían al estrés oxidativo, los que reaccionaban con movimiento cuando se tocaban con el asa de siembra, mientras, los que no respondían a ningún estímulo externo eran considerados muertos (Lithgow *et al.*, 1995).

3.2.8. ENSAYOS DE LONGEVIDAD

Los gusanos sincronizados en estado larvario L1 eran transferidos a placas de agar NGM, de diámetro 96 mm, suplementadas con los flavonoides objeto de estudio y sembradas con *E. coli* inactivadas térmicamente, y cultivadas a 20 °C hasta alcanzar el estado larvario L4. Una vez alcanzado este estado se transferían con un asa de platino a placas nuevas de 35 mm que también contenían los distintos flavonoides. Se transferían 15 nematodos por placa. Los 6 primeros días se cambiaban diariamente a placas nuevas, para evitar mezcla de generaciones. Tras finalizar su periodo reproductivo los gusanos eran transferidos cada 2 días a placas nuevas. Igual que en los anteriores ensayos, los gusanos eran considerados muertos si no respondían al toque suave con el asa de platino. Estos ensayos se llevaron a cabo con aproximadamente 100 gusanos por tratamiento y por triplicado.

3.2.9. CAPTACION Y METABOLISMO DE FLAVONOIDES

Estos ensayos se llevaron a cabo con el objeto de estudiar la incorporación de los distintos flavonoides por parte del nematodo e identificar las formas presentes en su organismo, a efectos de orientar sobre la naturaleza de los compuestos que podrían ser responsables de la actividad a nivel celular y/o molecular. En *C. elegans* la membrana es impenetrable a moléculas de pequeño tamaño por lo que se asume que los compuestos son incorporados al organismo por ingestión (Segalat, 2007).

Nematodos sincronizados en estado larvario L1 se sembraban en placas de agar NGM, de 96 mm de diámetro, que contenían los diferentes flavonoides (200 μ M) y eran cultivadas durante 4-6 días. Después de la incubación, los gusanos eran recogidos de las placas mediante sucesivos lavados, primero con tampón M9, luego con agua, seguido por dos veces con PBST (PBS + 0.01% Tween 20), una vez más con PBS y una última vez con agua. Para llevar a cabo la extracción de los flavonoides, la masas de gusanos se resuspendía en metanol y se mantenía a -20 °C durante 12 a 16 h para facilitar la disgregación de las células y la consiguiente extracción de los compuestos de interés. Posteriormente, el homogeneizado metanólico se trataba durante 5 min en baño de ultrasonidos y se sometía a agitación con la ayuda de un vortex durante 1 min, tras lo cual las muestras eran centrifugadas durante 5 min a 3,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante era recogido y el precipitado se sometía al proceso de extracción dos veces más. Los extractos metanólicos reunidos se llevaban a sequedad en un concentrador rotatorio micVac y el residuo finalmente obtenido se disolvía en 100 μ L de metanol:agua (20:80 v/v) para su análisis por HPLC-DAD-ESI/MS.

3.2.10. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinó el contenido de proteínas en las masas de *C. elegans* con el objeto de tener un dato cuantitativo objetivo y comparable entre los distintos ensayos y de esta forma poder expresar las cantidades de flavonoides determinadas en los gusanos con relación a las mismas. Para la preparación del extracto proteico de las muestras se empleó una adaptación del protocolo descrito por Reinhart y Ruvkun (2001) con algunas pequeñas modificaciones, y posteriormente las proteínas de dichos extractos se determinaron por el método de Bradford.

Preparación del extracto proteico

Los gusanos se recuperan del residuo del pellet formado en la determinación de metabolismo de flavonoides, se anota el volumen de pellet de gusanos antes de congelar. Mientras los gusanos están aun congelados se adiciona el doble de volumen de tampón 2X SDS, preparado con la siguiente composición:

2X SDS (5mL)

- 20% SDS (4% final)	1 mL
- 2M Tris.Cl, pH 6.8 (100 mM final)	250 μ L
- Glicerol (20% final)	1 mL
- Agua	2,75 mL

El pellet de gusanos suspendido en el tampón se mantiene en ebullición durante 15 min en baño maría, agitándose en vortex a mitad del ciclo. Los tubos se centrifugan a 5000 rpm durante 5 min para precipitar el material insoluble y el sobrenadante se transfiere a un tubo separado donde se lleva a un volumen determinado con tampón 2X SDS para la determinación de proteínas.

Determinación de proteínas (método Bradford)

La presencia de glicerol en el tampón 2X SDS interfiere la cuantificación de proteína, por lo que es importante diluir las muestras y medir los compuestos, y estándar en el tampón usado para las muestras.

El reactivo de Bradford se mezcla bien por agitación suave en la botella y se lleva a temperatura ambiente. Se preparan disoluciones estándar de seroalbúmina bovina (BSA), en tampón fosfato, de concentración comprendida entre 12,5 y 150 $\mu\text{g/mL}$. Para corregir la posible interferencia que pueda producir la presencia del glicerol en el medio de reacción, se toman 50 μL de cada solución de BSA y se adicionan 10 μL de tampón 0,1X SDS y 940 μL de PBS, para obtener concentraciones de proteína en el intervalo 0,6 a 7,5 $\mu\text{g/mL}$. Para el blanco se toman 10 μL de tampón 0,1X SDS y se completa hasta 1 mL con PBS (990 μL).

Para el análisis de las proteínas en las muestras es necesario realizar una dilución previa del extracto proteico con agua, en una proporción 1:10 (extracto:agua), aunque dicha proporción puede variar en función de la cantidad de gusano presente en el extracto inicial. De esta dilución se toma 10 μL y se lleva a 1 mL con PBS. A cada tubo de estándar y de muestras se añade 1 mL del reactivo de Bradford, se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 5 a 45 min (el complejo proteína-colorante es estable durante unos 60 min). A continuación, las muestras se transfieren a cubetas y se mide la absorbancia a 595 nm, en un intervalo de tiempo no superior a 10 min entre la primera y la última muestra.

La concentración de proteína en las muestras se calcula por interpolación de los valores de absorbancia en la recta de calibrado obtenida con las disoluciones estándar de BSA.

3. 2. 11. ANÁLISIS HPLC-DAD-ESI/MS

a) Flavonoles

Para la separación cromatográfica, se utilizó un equipo Hewlett-Packard 1100, equipado con una bomba cuaternaria, inyector automático, sistema de termostatación de columnas y detector de diodos en circuito integrado, dotado de

una célula de flujo para altas presiones con conexión al espectrómetro de masas, acoplado a una estación de control y tratamiento de datos HP ChemStation. La separación se llevó a cabo mediante una columna Ascentis™ RP-Amide 3 μm (2,1 x 150 mm), termostatizada a 35 °C. Las fases móviles fueron: (A) ácido fórmico al 0,1% en agua y (B) 100% de acetonitrilo, y se estableció el siguiente gradiente: de 15% a 50% de B durante 15 minutos, isocrático a 50% de B durante 10 minutos, paso de 50% a 75% de B en 3 minutos, isocrático a 75% de B durante 10 minutos, seguido de un equilibrado de la columna. Se trabajó con un flujo de 0,2 mL/min. La longitud de onda preferente seleccionada fue 370 nm, también se registró el cromatograma a 280 nm. Los espectros fueron registrados desde 220 nm hasta 600nm.

Para el análisis de espectrometría de masas se empleó un espectrómetro de masas API 3200 Qtrap (Applied Biosystems), equipado con una onda de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas triple cuadrupolo que puede actuar además como trampa iónica, acoplado por el software de tratamiento de datos Analyst 5.1. La detección se realizó en modo negativo, registrando espectros de masas entre m/z 100 y m/z 1000. El análisis de metabolitos se realizó mediante dos métodos, en ambos el espectrómetro de masas fue programado para realizar una serie de dos análisis consecutivos. Las condiciones de análisis de masas fueron optimizadas para ambos métodos y experimentos con quercetina. Se empleó como gas nebulizador (20 psi) y turbo gas (400°C, 30 psi) para la eliminación del eluyente aire Zero, y nitrógeno como gas cortina (20 psi) y gas de colisión medio.

- a) El primer método empleado fue *full scan* a alta sensibilidad (Enhanced MS, EMS). Los parámetros fueron: voltaje del capilar, -4500V. Como potenciales: declustering potential (DP) -50V, potencial de entrada (EP) -6 V, energía de colisión (CE) -10V. Seguido de este análisis se empleó el experimento *Enhanced Product Ion* (EPI) para obtener la fragmentación característica de ion mayoritario obtenido en el primer experimento. Las condiciones empleadas: DP -50V, EP-6 V, CE-25V y collision energy spread (CES) 0 V.
- b) El siguiente método empleado fue un análisis *precursor ion*, para detectar todos los iones precursores que fragmenten a m/z 301, correspondiente a la quercetina, seguido de un Enhanced Product Ion (EPI), para obtener la fragmentación característica del ion padre de las transiciones estudiadas en el primer experimento. Los parámetros para el primer experimento fueron: voltaje del capilar, -4500V; DP -40V, EP -10 V y CE -50V y cell exit potencial (CXP) -3V. Seguido de este análisis se empleó el experimento Enhanced Product Ion (EPI) para obtener la fragmentación característica de ion mayoritario obtenido en el primer experimento.

Las condiciones empleadas: DP -50V, EP-6 V, CE-25V y collision energy spread (CES) 0 V.

Cuantificación

Para el análisis cuantitativo de los metabolitos absorbidos por el gusano, se realizaron las curvas de calibrado con los estándares correspondientes a quercetina, quercetina 3-O-glucósido, isoramnetina, tamarixetina. Se calcularon inyectando distintas concentraciones de la solución patrón, en las mismas condiciones cromatográficas que las muestras, realizándose la regresión lineal frente al área del pico obtenida en cada caso. Los resultados fueron expresados en μg de compuesto/mg proteína del gusano

b) Flavanoles

El Análisis de flavanoles fue llevado a cabo en el cromatografo indicado en el método de flavonoles, para la separación se utilizó una columna analítica Waters Spherisorb S3 ODS-2 C 8, 3 μm (4,6 x 150 mm) termostatzada a 30 °C. Los solventes usados fueron: (A) 0,1 % ácido fórmico, (B) 100% de acetonitrilo. El gradiente de elución establecido fue: de 100% A a 15% B durante 35 min, paso de 15% a 40% de B en 10 minutos, isocrático a 40% de B durante 5 minutos, seguido de un equilibrado de la columna. Se trabajó con un flujo de 0,5 mL/min. La longitud de onda preferente seleccionada fue 280 nm. Los espectros fueron registrados desde 220 nm hasta 600nm.

Para el análisis de masas se empleó el mismo equipo descrito para el análisis de flavonoles. Se realizó también en modo negativo, registrando espectros de masas entre m/z 100 y m/z 1000. El análisis de metabolitos se realizó mediante dos métodos, en ambos el espectrómetro de masas fue programado para realizar una serie de dos análisis consecutivos. Las condiciones de análisis de masas fueron optimizadas para ambos métodos y experimentos con epicatequina. Se empleó como gas nebulizador (20 psi) y turbo gas (400°C, 30 psi) para la eliminación del eluyente aire Zero, y nitrógeno como gas cortina (20 psi) y gas de colisión medio.

- a) El primer método empleado fue *full scan* a alta sensibilidad (Enhanced MS, EMS). Los parámetros fueron: voltaje del capilar, -4000V. Como potenciales: DP -40V, EP -7 V y CE -20V. Seguido de este análisis se empleó el experimento Enhanced Product Ion (EPI), cuyas condiciones fueron: DP -40V, EP-10 V, CE-25V y CES 0 V.
- b) El siguiente método empleado fue un análisis *precursor ion*, para detectar todos los iones precursores que fragmenten a m/z 289, correspondiente a la (epi)catequina, seguido de un Enhanced Product Ion (EPI), para obtener la fragmentación

característica del ion padre de las transiciones estudiadas en el primer experimento. Los parámetros para el primer experimento fueron: voltaje del capilar, -4000V; DP -40V, EP -10 V, CE -50V y CXP -3V. Las condiciones empleadas para el segundo experimento EPI: DP -40V, EP-10 V, CE-50V y CXP-3 V.

3.2.12. SÍNTESIS Y PURIFICACION DE METILADOS DE EPICATEQUINA

Los metiléteres de epicatequina se llevó a cabo por síntesis química mediante el protocolo descrito por (Gonzalez-Manzano *et al.*, 2009) una adaptación del método descrito previamente por Donovan *et al.* (1999). Se preparaba una mezcla de epicatequina (250 mg), carbonato potásico (500 mg) y metil yoduro (1 mL) en acetona (20 mL) y se irradiaba en un baño de ultrasonidos durante 3,5h. Transcurrido este tiempo, el solvente se filtraba y concentraba a sequedad en rotavapor. Los productos de la reacción (diferentes monometiléteres de epicatequina) se aislaban posteriormente de la mezcla por HPLC semipreparativa.

Para el aislamiento y purificación de los compuestos 3' y 4'-O-metilepicatequina se utilizó un equipo de HPLC-semipreparativa Waters 600, conectado a un detector UV-Vis y un colector de fracciones (Waters Fraction Colector, Massachussets, USA). La separación se llevó a cabo mediante una columna Ascentis™ C18 (10 x 250 mm, 5 μ m). Las fases móviles fueron: (A) ácido acético al 5% en agua y (B) 100% de metanol, y se estableció el siguiente gradiente: de 0% a 20% de B durante 15 minutos, de 20-30% de B en 25 minutos, y de 30-40% de B en 5 minutos. Se trabajó con un flujo de 3 mL/min. La detección se llevó a cabo a 280 nm. Las fracciones obtenidas se concentraban a sequedad a vacío y eran redisueltas en una pequeña cantidad de agua para su posterior liofilización. La pureza de los compuestos obtenidos se analizaba por HPLC-DAD-MS, según el método descrito en el apartado 3.2.11b.

3.2.13. CUANTIFICACIÓN ARNm POR PCR EN TIEMPO REAL

Nematodos sincronizados en estado larvario L1 se sembraban en placas de agar NGM, de 96 mm de diámetro, que contenían los diferentes flavonoles, quercetina, isoramnetina y tamarixetina (200 μ M) y eran cultivadas a 20 °C durante 6 días. Después de la incubación, los gusanos eran recogidos de las placas mediante sucesivos lavados con agua y congelados en N₂ líquido para llevar a cabo la posterior homogeneización del extracto de gusanos mediante un mortero, mantenido también en N₂ líquido para evitar la degradación del ARN. Para la extracción del ARN total del homogeneizado de gusanos se utilizó un kit de Qiagen. La transcripción inversa se realizó usando el kit de síntesis de cADN (Roche, Mannheim, Alemania) y el cADN fue

producido utilizando primers de secuencia random. Los primers de PCR en tiempo real fueron los siguientes: *let-767*, 5'-CGGATACATCACGCATCAAC, 5'TCTTCTGAGAGCAGCAGCA; *act-1*, 5'- CCAGGAATTGCTGATCGTATG, 5'-GGAGAGGGAAGCGAGGATAG; *ama-1*, 5'-CTGACCCAAAGAACACGGTGA, 5'-TCCAATTCGATCCGAAGAAGC; *18s*, 5'-10TTCTCCATGTCCGGGATAG, 5'-CCCCACTCTTCTCGAATCAG. El análisis de la expresión de ARNm se llevó a cabo por triplicado en un sistema de detección Applied Biosystem 7300. La curva de disociación fue determinada para confirmar una única amplificación. Se usaron tres controles internos, *act-1*, *ama-1* y *18s* para llevar a cabo la cuantificación relativa de la expresión del gen *let-767*.

3.2.14. ANÁLISIS DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación del estado de oxidación de proteínas se realizó usando el kit comercial OxyBlot™ (Millipore, USA). Los gusanos en estado larvario L1 se sembraron en placas de agar NGM, de 96 mm de diámetro, que contenían los diferentes flavonoles y cultivados a 20 °C. Paralelamente se llevó a cabo un ensayo control en ausencia de flavonoles. Después de 6 días de incubación, los gusanos eran recogidos de las placas mediante sucesivos lavados con agua. Para la extracción de las proteínas de los gusanos, se suspendió el pellet en dos volúmenes de tampón de lisado (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 y 1% Nonidet P40 y una mezcla de inhibidores de proteasas) y fue homogeneizado en un vortex durante 30 minutos para facilitar la ruptura de la cutícula de los gusanos. El homogeneizado era centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos, para obtener el sobrenadante y realizar el análisis de proteínas. La concentración de proteínas se determinó usando el método de BCA mediante un Kit comercial BCA™ (Pierce, Rockford, USA). Después se llevó a cabo la determinación del estado de oxidación de proteínas mediante el kit comercial OxyBlot™ (Millipore, USA), mediante la derivatización de los grupos carbonilos de las proteínas mediante DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina). Los ensayos fueron llevados en triplicado, usando dos cantidades de proteínas 15,5 y 6,5 µg. Las proteínas derivatizadas se fijaron sobre un gel de poliacrilamida SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF, incubadas con dos anticuerpos, primario y secundario, proporcionados en el kit. El revelado de la membrana se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia, y la detección se realizó mediante un equipo de detección western Blotting (Amershan, Buckinghamshire, UK), usando como marcador de peso molecular la actina. La membrana se lavó para eliminar la señal y se hibridó posteriormente usando anticuerpos (Santa Cruz Biotechnology, inc., CA, USA) contra la actina (H-300).

IV. ESTUDIOS PRELIMINARES

4.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se pretende dar una visión de los métodos y procedimientos que han sido necesarios optimizar para realizar los ensayos que se describirán en los capítulos posteriores. En particular los objetivos de estos estudios preliminares estuvieron encaminados a:

- a) Elegir el disolvente para incorporar los compuestos a estudiar en el medio de cultivo, y establecer las concentraciones de éstos para estudios posteriores.
- b) Evaluar la estabilidad de los flavonoides en el medio de cultivo NGM
- c) Determinar si había diferencias en el uso de las bacterias vivas o muertas como fuente de alimento de los gusanos.
- d) Optimizar el método para la determinación de proteínas en los extractos de gusanos.

4.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DISOLUCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

La mayoría de los estudios que se han llevado a cabo anteriormente para estudiar los efectos de flavonoides sobre *C. elegans* se han realizado en medio líquido. Sin embargo, este tipo de medios presentan algunos inconvenientes para ensayos como los de longevidad y de reproducción, ya que los gusanos en medio líquido dejan de poner huevos al exterior del nematodo, los mantienen dentro de tal forma que eclosionan en el interior y se lo comen (Bany *et al.*, 2003). Por ello nos planteamos la realización de los ensayos en medio sólido. Los interrogantes que surgieron fueron qué disolvente usar para solubilizar los compuestos e incorporarlos a las placas y en qué concentración. Estos ensayos se llevaron a cabo con la quercetina, ya que por su baja solubilidad en medios acuosos representaba uno de los compuestos a ensayar más problemáticos para su incorporación a los medios de cultivo.

Tras una serie de pruebas con diversos disolventes, se optó por utilizar dimetilsulfóxido (DMSO), con el cual ya había antecedentes en la bibliografía de uso en ensayos con *C. elegans* (Viswanathan *et al.*, 2005; Bass *et al.*, 2007; Kampkötter *et al.*, 2007a, b, c; Wang *et al.*, 2010). En un primer ensayo se prepararon disoluciones madre de quercetina 1 y 10 mM en DMSO, a partir de las cuales se incorporaba el compuesto en el medio de cultivo para obtener concentraciones finales de quercetina en las placas de 10, 50, 100 y 200 μ M. Al sembrar los gusanos en estas placas se observó una gran mortalidad, lo cual hacía pensar en una posible toxicidad del disolvente, ya que al partir de concentraciones madre muy diluida era necesario añadir mucho volumen de DMSO al medio para llegar a las concentraciones finales de flavonoide deseadas. Para comprobarlo se procedió a estudiar los efectos de este disolvente sobre la reproducción y crecimiento de *C. elegans*. El ensayo se realizó en placas con medios a los que se adicionaba DMSO a concentraciones finales de 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 y 1,0 %. Se prepararon dos placas para cada una de estas concentraciones donde se sembraron 10 gusanos en estado L1, cuyo desarrollo era evaluado diariamente hasta el sexto día. En estos ensayos era utilizada la bacteria *E. coli* OP50 viva como fuente de alimento para los nematodos. El ensayo se llevó a cabo por duplicado y los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.1.

Tabla IV.I. Efecto de concentración de DMSO en el medio de cultivo sobre el desarrollo del *C. elegans*.

% DMSO	Días de cultivo de <i>C. elegans</i> /estado de desarrollo					
	1	2	3	4	5	6
0	L ₁ .	L ₂ - L ₃	L ₃ - L ₄	L ₄	Ad*	Ad*
0,05	L ₁ .	L ₂ - L ₃	L ₃ - L ₄	L ₄	Ad*	Ad*
0,1	L ₁ .	L ₂ - L ₃	L ₃ - L ₄	L ₄	Ad*	Ad*
0,2	L ₁ .	L ₂ - L ₃	L ₃ - L ₄	L ₄	Ad*	Ad*
0,5	L ₁ .	L ₁ - L ₂	L ₃	L ₃ - L ₄	L ₄	Ad
1,0	L ₁ .	L ₁ - L ₂	L ₃	L ₃ - L ₄	L ₄	Ad

L= Estado larvario

Ad = gusanos adultos

Ad*= gusanos adultos poniendo huevos y con presencia de larvas

Se observó que el desarrollo del nematodo no se veía afectado por el DMSO a concentraciones inferiores a 0,2%, a las cuales mostraba el mismo comportamiento que el control (0% DMSO), siendo el desarrollo el esperado según su ciclo de vida. Sin embargo, en las placas con DMSO 0,5 y 1,0% se producía un retraso en el desarrollo normal del nematodo, de manera que el estado L₄ se alcanzaba en el quinto día en vez de al tercer o cuarto día como ocurría para concentraciones menores de DMSO y en los controles. A la vista de estos resultados los ensayos posteriores con los flavonoides estudiados se llevaron a cabo con concentraciones de DMSO en las placas de 0,2%.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Wang *et al.* (2010) que observaron que concentraciones de DMSO menores de 0,2 % no producían un aumento significativo de la longevidad, mientras que concentraciones mayores de 0,5 % alargaban el tiempo de vida medio y máximo de *C. elegans*.

Un problema adicional que se encontró en la preparación del medio de cultivo (NGM) fue que, aunque la quercetina inicialmente era soluble en el mismo, se producía su precipitación durante la solidificación del agar. Tras varios ensayos, se consiguió resolver este inconveniente colocando las placas sobre una superficie de

hielo, lo que hacía que la solidificación del agar fuera más rápida y se evitaba de esta manera la precipitación del flavonoide.

Por otra parte, se realizó un ensayo previo destinado a optimizar la concentración de quercetina para llevar a cabo los ensayos posteriores. Para ello se prepararon placas con diferentes concentraciones de quercetina (100 a 500 μM) donde se sembraban los gusanos en estado L1 y se mantenían hasta alcanzar el estado L4. Al cabo de este tiempo se recogían los gusanos y se procedía a extraer y analizar por HPLC la quercetina acumulada por el nematodo, según el método descrito en el apartado de materiales y métodos 3.2.11.

Se encontró que la incorporación de quercetina por el gusano aumentaba para concentraciones del flavonoide en el medio hasta 200 μM , a partir de la cual la cantidad de quercetina en el organismo del animal se mantenía constante, sugiriendo una saturación en la capacidad de captación del compuesto por el nematodo. Por lo tanto, se eligió la concentración de 200 μM para ensayos posteriores. En estudios sobre el efecto de distintas concentraciones de quercetina sobre la longevidad de *C. elegans* otros autores observaron que los mayores aumentos en el tiempo de vida medio del animal se producían para concentraciones del flavonoide de 200 μM (Saul *et al.*, 2009; Pietsch *et al.*, 2009).

4.2. ENSAYOS DE ESTABILIDAD DE FLAVONOIDES EN EL MEDIO

El objetivo de este ensayo era comprobar la estabilidad de los compuestos a ensayar en las placas de cultivo, ya que las mismas se preparan en lotes de placas en función del ensayo a realizar y se mantienen en refrigeración durante un tiempo variable desde su preparación hasta su uso, que podría llegar en algunos casos a más de 30 días (p.ej., en los ensayos de longevidad). Estos ensayos se realizaron con quercetina, epicatequina y quercetina 3-O-glucósido. En cada caso se prepararon 30 placas con diámetro de 96 mm con los compuestos en una concentración final de 200 μM . Paralelamente se realizaban controles con DMSO a una concentración final de 0,2%, igual a la existente en los medios que contenían los flavonoides. Las placas se mantenían en refrigeración durante 1 mes y cada 5 días se tomaban 5 placas por compuesto para proceder a la extracción y análisis cromatográfico del flavonoide. La extracción se realizaba con metanol al 80% (600 μL por placa) bajo agitación durante 2 min. El proceso se repetía dos veces más, los extractos metanólicos reunidos se centrifugaban, el sobrenadante se llevaba a sequedad en un concentrador rotatorio

micVac y el residuo finalmente obtenido se redisolvió en 200 μL de metanol 20% para su análisis por HPLC-DAD-ESI/MS, como se describe en el apartado 3.2.11.

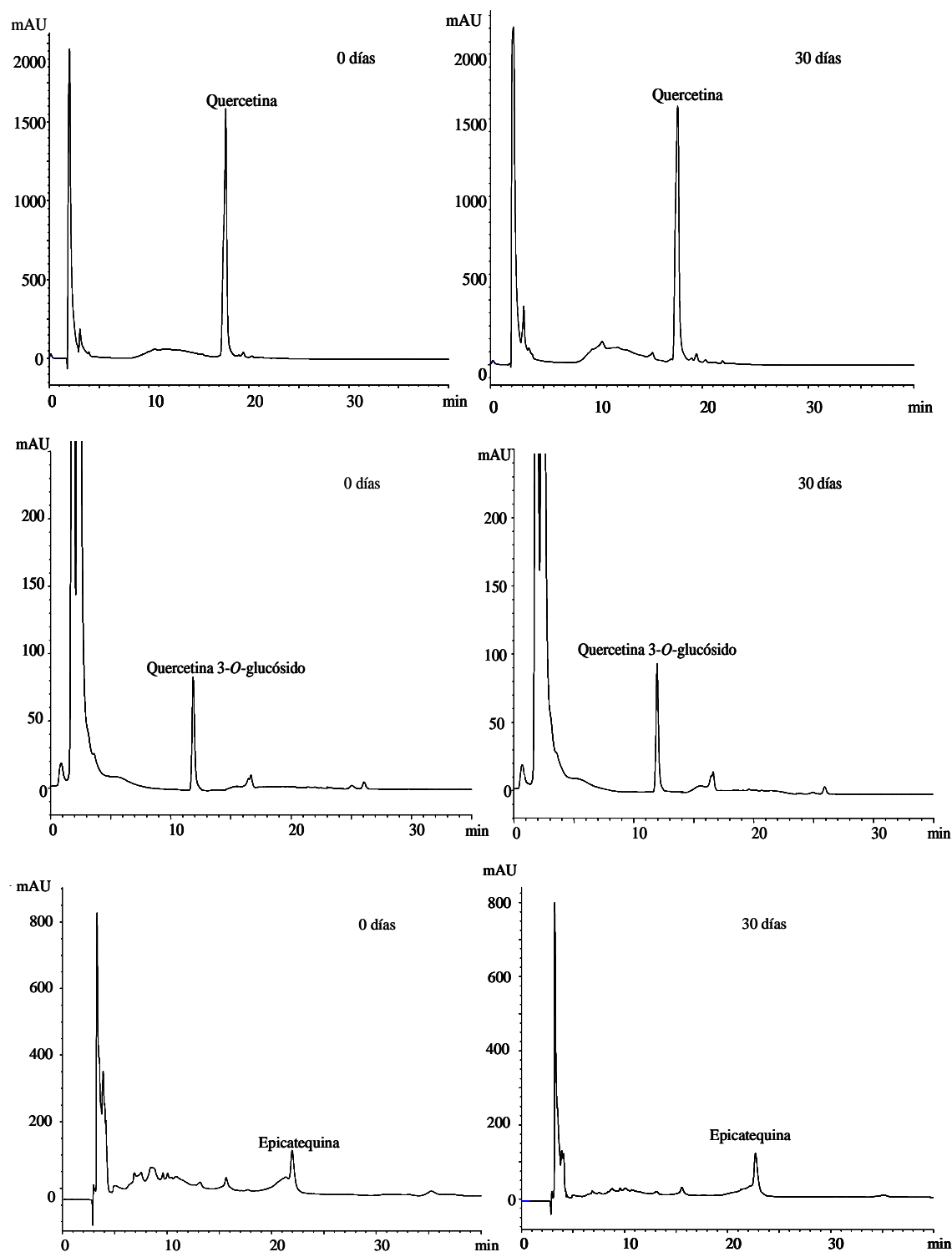


Figura IV.1. Cromatogramas registrados a 370 nm correspondientes a las placas de quercetina y quercetina 3-O-glucósido, y a 280 nm para las placas de epicatequina, obtenidos tras a 0 y 30 días de almacenamiento.

En la Figura IV.1 se representan los cromatogramas obtenidos en los ensayos para cada flavonoide tras 0 y 30 días de almacenamiento de las placas en refrigeración. En todos los casos se observa que los compuestos eran estables en las placas durante este tiempo, sin que se produjeran pérdidas significativas de concentración ni aparición de posibles productos de su degradación.

4.3. INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS SOBRE LA INCORPORACIÓN Y METABOLIZACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

Una posibilidad que se planteaba era si la incorporación de los flavonoides por el nematodo (y, en su caso, la posible metabolización) se producía de manera directa por él mismo o era resultado de una captación y posible transformación previa por parte de las bacterias usadas como fuente de alimento de los gusanos.

Para concluir sobre este punto se realizaron ensayos incubando los gusanos en presencia de quercetina en medios de cultivo que contenían alternativamente bacterias vivas o muertas (por tratamiento térmico a 65 °C durante 30 min). Paralelamente, se llevaba a cabo un control incubando los gusanos en medios de cultivo con bacterias vivas o muertas en ausencia del flavonoide. Al cabo de 5-6 días los gusanos se recolectaban, homogeneizaban y los compuestos se extraían y se analizaban por HPLC-DAD, como se describe en el apartado 3.2.11.

En la figura IV.2 se muestran los cromatogramas correspondientes a los extractos de gusanos incubados en placas que contenían quercetina, con bacterias vivas y muertas. Se pueden observar que el perfil cromatográfico en ambas muestras es igual, lo que sugiere que las bacterias no intervienen de manera relevante en la captación y posible biotransformación de quercetina. No obstante, aunque se confirmó que la bacteria no capta ni metaboliza el compuesto, se decidió realizar los posteriores ensayos con bacterias muertas, ya que se había comprobado que esta circunstancia no influía sobre el desarrollo y la viabilidad de los gusanos y esto permite un mayor control de la cantidad de alimento en las placas. Por otra parte, varios autores han descrito que la utilización de bacterias vivas como fuente de alimento para *C. elegans* acorta la vida de los nematodos independientemente de la concentración de alimento (Garigan *et al.*, 2002), probablemente debido a que, como indican Sánchez y Stuart 2011, la patogenicidad de la *E. coli* viva usada como alimento es una de la mayores fuente de variabilidad en la vida de *C. elegans* debido a la activación variable de la ruta de señalización de la insulina.

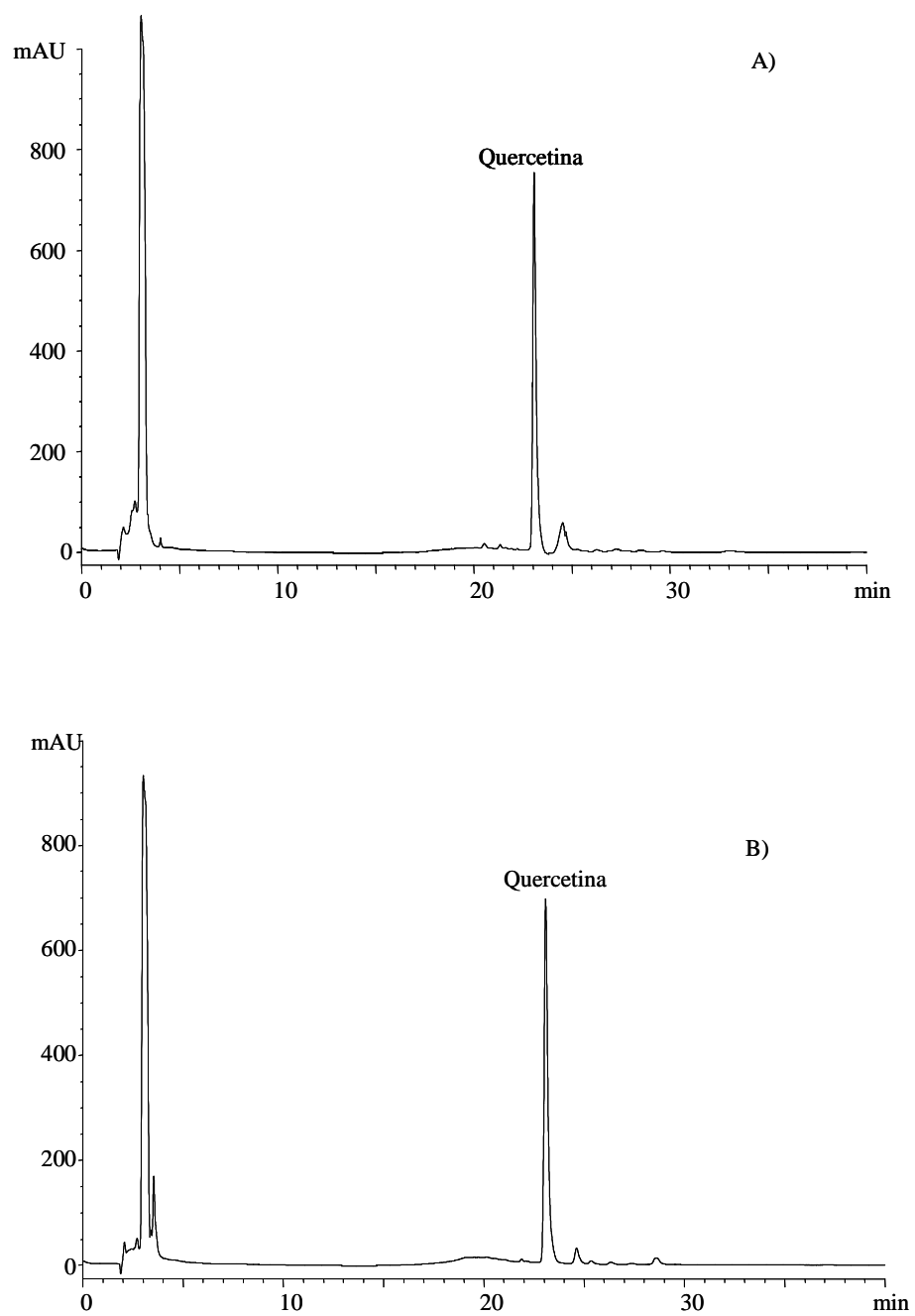


Figura IV.2. Cromatogramas registrados a 370 nm correspondientes a extractos de gusanos cultivados en presencia de (A) bacterias vivas y (B) bacterias muerta.

4.4. OPTIMIZACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN *C. elegans*

Con el objetivo de tener una idea cuantitativa de la cantidad de flavonoides incorporados por el nematodo se decidió expresar los mismos con relación al contenido de proteína total. Por ello, se procedió a optimizar el método para la determinación de proteínas en los homogeneizados de gusanos.

Se partió de 10 placas con gusanos cultivados desde el estado de larva L1 hasta el sexto día en que eran recogidos. Primeramente se procedía al lisado de los gusanos siguiendo el método propuesto por Reinhart and Ruvkun (2001) y que consiste básicamente en el tratamiento de la masa de gusanos con tampón SDS para favorecer digestión. Posteriormente, se procede a la determinación del contenido en proteínas por el método de Bradford (1976). La concentración de proteína en las muestras se calculaba por interpolación de los valores de absorbancia en una recta de calibrado obtenida con disoluciones estándar de seroalbúmina bovina (BSA) (Tabla IV.2. y Figura IV.4).

Tabla IV.2. Valores de absorbancia de los estándares de BSA método Bradford.

BSA $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia	CV %
0,625	$0,0175 \pm 0,0008$	4,56
1,25	$0,414 \pm 0,0007$	1,74
2,5	$0,919 \pm 0,0005$	0,51
5,0	$0,202 \pm 0,0009$	0,45
7,5	$0,297 \pm 0,0022$	0,73

*Los valores de absorbancia es el promedio de 3 repeticiones.

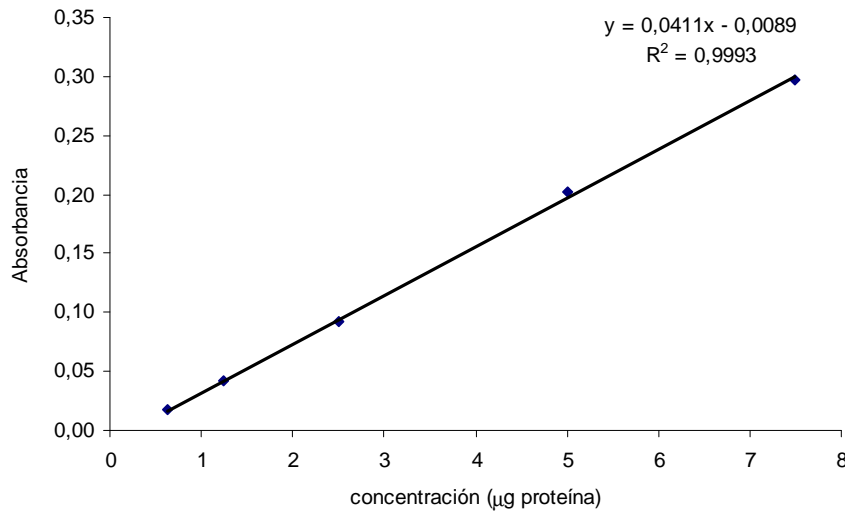


Figura IV.4. Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Bradford obtenida usando BSA como proteína de referencia.

En las condiciones de ensayo se observó linealidad entre las concentraciones de 0,6 a 7,5 mg/mL ($R^2 = 0,999$) así como una reproducibilidad en la respuesta. La Tabla IV.3 muestra los resultados de la determinación de proteína en cultivos de gusanos en tres días diferentes. Se trató que las variables como cantidad de gusanos sembrados y cantidad de alimento fueran similares en los días de realización del ensayo. El valor de cada día representa el promedio de cuatro repeticiones. Se puede observar una reproducibilidad, expresada como coeficiente de variación, inferior al 5.0%.

Tabla IV.3. Determinación de Proteína en muestras de *C. elegans*

Día	μg de proteína	Reproducibilidad(coeficiente de variación porcentual)
1º	1227,2 ± 55,4	4.5
2º	1437,1 ± 37,8	2.6
3º	1445,1 ± 123,4	5.0

V. ESTUDIO SOBRE LOS EFECTOS DE QUERCETINA Y SUS METABOLITOS O-METILADOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, TERMOTOLERANCIA, LONGEVIDAD Y BIODISPONIBILIDAD EN *Caenorhabditis elegans*.

5.1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios epidemiológicos han establecido que la ingesta de flavonoides en la dieta está inversamente asociada con el riesgo de enfermedades coronarias, cáncer y disfunciones inmunes (Hertog *et al.*, 1993; Knekt *et al.*, 1996; Yochum *et al.*, 1999). La quercetina es uno de los flavonoides más abundante en la dieta humana, al que se ha prestado mucha atención debido principalmente a sus propiedades antioxidantes y como captador de radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1996; Cook y Samman, 1996).

La mayoría de los conocimientos sobre actividad biológica de quercetina derivan de ensayos *in vitro* mientras que los datos *in vivo* son escasos. Para poder superar esta limitación y para obtener nuevos conocimientos acerca de los efectos de los flavonoides en modelos *in vivo*, se han realizado algunos estudios en el nematodo *C. elegans*, especialmente con respecto a longevidad y resistencia frente a estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2006; Kaempkötter *et al.*, 2007a, b y c, 2008; Saul *et al.*, 2008; Piestch *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

Las ventajas de usar *C. elegans* como un modelo *in vivo* ya han sido descritas en el apartado I de interés y objetivos, y derivan principalmente de su fácil manejo, bajo coste y ciclo de vida corto, que permiten la rapidez y facilidad de trabajo de un microorganismo, pero con las ventajas de un modelo animal real.

Como se ha indicado en el apartado de revisión bibliográfica, diversos autores han estudiado la respuesta de *C. elegans* a la exposición a extractos ricos en flavonoides obtenidos, por ejemplo, de arándanos o *Ginkgo biloba*, encontrando que en general aumentan la resistencia al estrés oxidativo y térmico, y prolongan la vida media en gusanos de tipo silvestre (Wu *et al.*, 2002; Strayer *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Kampkötter *et al.*, 2007a). Se ha observado que flavonoles como quercetina, kaempferol, fisetina y rutina son capaces de reducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en gusanos sometidos a estrés oxidativo (Kampkötter *et al.*, 2007b,c). También se ha mostrado que la quercetina ejerce un notable efecto protector frente al estrés térmico y reduce la acumulación de marcadores de envejecimiento, como lipofuscina, un pigmento que resulta de la degeneración oxidativa de los componentes celulares (Garigan *et al.*, 2002; Gerstbrein *et al.*, 2005).

Son, sin embargo, escasos los estudios sobre el metabolismo y disponibilidad de flavonoides en *C. elegans*, y tener una idea sobre la incorporación de estos compuestos por el organismo parece un prerequisite esencial para profundizar en las causas de los efectos sistémicos observados. Según nuestro conocimiento, únicamente

hay al respecto un trabajo relacionado con quercetina llevado a cabo en medio líquido. Ese estudio confirma la absorción de quercetina por parte del nematodo pero no identifica posibles metabolitos generados por parte del animal (Kampkötter *et al.*, 2008).

Los flavonoles, como quercetina, se encuentran en los alimentos casi exclusivamente en forma de glicósidos. En el organismo humano, tras su ingestión, algunos de estos compuestos son desglicosilados por β -glicosidasas, y los aglicones producidos incorporados por el enterocito e inmediatamente conjugados en el mismo y posteriormente en el hígado a derivados metilados, glucurónidos y/o sulfatos, reacciones que se desconoce si tienen lugar en *C. elegans*. Las principales rutas del metabolismo intermedio existentes en organismos heterótrofos están también presentes en *C. elegans* (Vastrik *et al.*, 2007), y bases de datos como WormBase, Reactome y KEGC muestran que este nematodo posee ortólogos para la mayor parte de las enzimas involucradas en dichas rutas. A pesar que *C. elegans* no posee tejido adiposo o hígado, algunas de sus funciones podrían estar expresadas en otros tejidos tales como el intestino (Lee *et al.*, 2009). Por ejemplo, las glicosiltransferasas, con función en el metabolismo de carbohidratos, parecen estar expresadas en el tracto digestivo del gusano (Griffitts *et al.*, 2003; McKay *et al.*, 2004).

Los metabolitos conjugados pueden presentar propiedades biológicas diferentes a las de los aglicones o los glicósidos originales. Por ejemplo, se ha demostrado que la metilación y la glucuronidación disminuyen la actividad antioxidante *in vitro* con respecto a la quercetina (Crawford *et al.*, 1960; Lemanska *et al.*, 2004; Dueñas *et al.*, 2010). Sin embargo, no existen estudios sobre el efecto de metabolitos conjugados de quercetina sobre *C. elegans*.

Teniendo en cuenta que la metilación a isoramnetina (3'-O-metilquercetina) o tamarixetina (4'-O-metilquercetina) es un paso importante en el metabolismo de la quercetina en humanos, en este capítulo nos planteamos como objetivo el estudiar el efecto de la quercetina y sus metabolitos metilados sobre las características fenotípicas, resistencia al estrés oxidativo y térmico, longevidad y biodisponibilidad en *C. elegans*.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

a) Longitud del cuerpo

En la Figura V.1 se representa la influencia de los tres flavonoles ensayados sobre la longitud del gusano, determinada al sexto día de adulto. Se observó que los gusanos tratados con tamarixetina o isoramnetina (200 μ M) no presentaban diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control (gusanos no tratados). El tratamiento con tamarixetina producía una ligera disminución, aunque no significativa, en el tamaño del gusano de aproximadamente un 4%, con respecto al control. Contrariamente, el tratamiento con isoramnetina producía un ligero aumento en la longitud del gusano de un 3% (no significativo), mientras que el tratamiento con quercetina aumentaba significativamente la longitud del mismo aproximadamente un 11%.

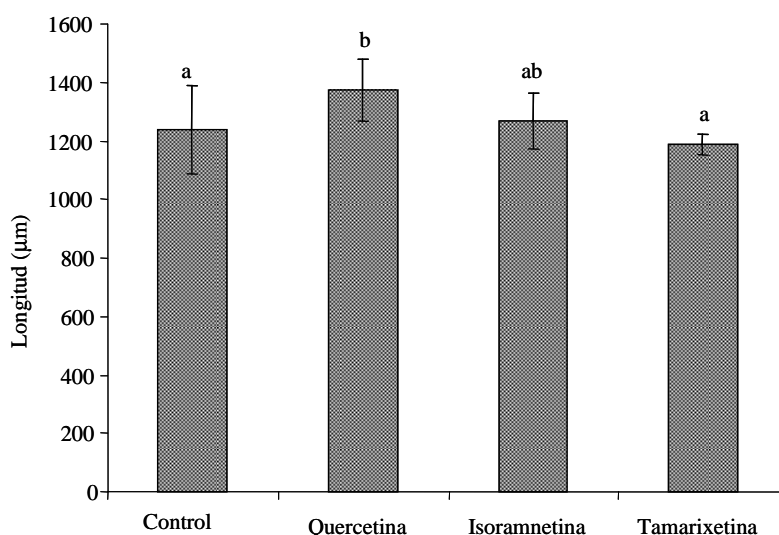


Figura V.1. Efecto de los flavonoles ensayados sobre la longitud del cuerpo de *C. elegans*.

La ligera reducción encontrada en el tamaño del gusano en el tratamiento con tamarixetina estaría de acuerdo con el resultado obtenido por Kampkötter *et al.* (2007) en su estudio realizado con un extracto de *Ginkgo biloba* cuyo principal componente era tamarixetina, donde encontró una disminución en la longitud del cuerpo del gusano de aproximadamente el 17%. Algunos autores han sugerido que la disminución en el tamaño del gusano podría explicarse por mecanismos similares a los inducidos por la restricción calórica (Lakowski, 1998), aunque también podría existir una

interferencia de los compuestos en los procesos de señalización que influyen en el tamaño del cuerpo de los gusanos. Otros autores no encontraron que el tratamiento con quercetina a 100 y 200 μM condujera a diferencias significativas en la longitud del gusano con respecto al control (Pietsch *et al.*, 2009). Hay que señalar, sin embargo, que en todos esos casos los ensayos eran realizados con una concentración de DMSO de 0,3%, más alta a la utilizada en nuestro trabajo (0,2%), lo que podría causar un retraso en el desarrollo del nematodo tal y como se comentó en el apartado IV.2 de esta memoria.

b) Reproducción

El desarrollo reproductivo de *C. elegans* no se vio afectado por el tratamiento con ninguno de los tres flavonoles ensayados. En todos los casos se observó que los gusanos empezaban a poner huevos desde el primer día de adulto hasta aproximadamente el cuarto día. No obstante, se detectó que el tratamiento con los derivados metilados de quercetina producía un retraso de algunas horas en la reproducción de los gusanos con respecto a los tratados con quercetina. En un primer ensayo se intentó llevar a cabo un estudio de la capacidad reproductiva por día de cada uno de los gusanos, pero había mucha variabilidad entre individuos del mismo grupo en cualquiera de los tratamientos, por lo que se optó por realizar la estimación promedio de la progenie (camada) en todo su periodo reproductivo, es decir en los cuatro días de duración del ensayo.

En la Figura V.2 se recoge el comportamiento reproductivo de los gusanos con los distintos tratamientos. Se puede observar que los tratados con quercetina (200 μM) aumentaban ligera aunque significativamente (9%, $p < 0,05$) la capacidad reproductiva del nematodo con respecto a los controles. Sin embargo, la reproducción no se veía significativamente afectada por el tratamiento con ninguno de los derivados metilados. Estos resultados eran coherentes con los obtenidos por Kampkötter *et al.* (2007), quienes tampoco encontraron diferencias en la reproducción de los nematodos tratados con extracto *Ginkgo biloba* cuyo componente mayoritario era la tamarixetina. Sin embargo, nuestros resultados discrepan de los obtenidos por Pietsch *et al.* (2009), que no observaron que la exposición a quercetina (100 y 200 μM) afectara a la capacidad reproductiva de *C. elegans*. La diferencia podría ser debida a que esos autores realizaron sus ensayos con nematodos de primera generación (F1) cuyos padres ya habían sido tratados con quercetina, mientras que en nuestro estudio se ha trabajado con líneas parentales del gusano desde estado larvario L1.

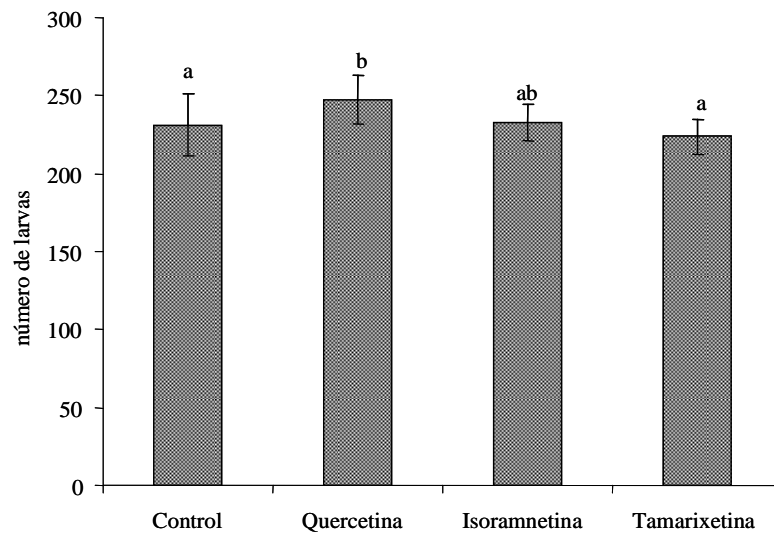


Figura V.2. Efecto de los tratamientos con flavonoles sobre la capacidad reproductiva de *C. elegans*.

Para evaluar si los efectos observados sobre la capacidad reproductiva tenían alguna relación con interferencias en el metabolismo estrogénico se estudió la expresión gen *let-767* en los gusanos tratados. Esta enzima comparte una alta homología con la 17-beta hidroxisteroide deshidrogenasa (tipos 3 y 12), enzima clave responsable en la formación y la activación de esteroides sexuales humanos, y es conocido que mutaciones que inactivan la enzima LET-767 afectan al crecimiento, reproducción y desarrollo de *C. elegans* (Desnoyer *et al.*, 2007). Se procedió a cuantificar el ARNm de la enzima LET-767 por PCR en tiempo real comparando con tres controles internos (*act-1*, *ama-1* y *18s*) (Figura V.3). Se encontró una sobreexpresión aparente del gen *let-767* en los gusanos tratados con quercetina e isoramnetina cuando los ensayos se normalizaban con relación a *act-1*, pero no cuando se usaban los otros controles internos (*ama-1* y *18s*), respecto a los cuales no se observaban diferencias relevantes en la expresión de dicho gen entre gusanos tratados y no tratados con ninguno de los flavonoles ensayados. Esta discordancia en los resultados no permitía concluir si el aumento de la capacidad reproductora del gusano estaba relacionado con el metabolismo estrogénico. Es, por tanto, necesario realizar más estudios para verificar qué mecanismos están involucrados en el aparente aumento de fertilidad en los gusanos tratados con estos flavonoles.

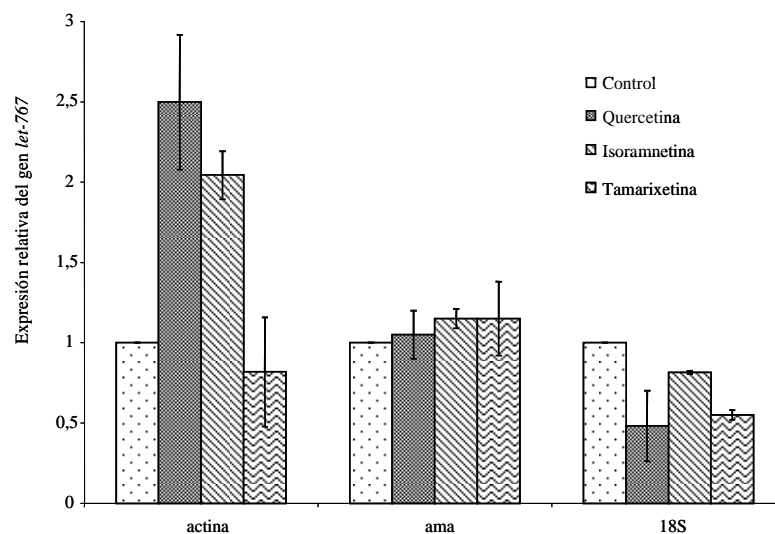


Figura V.3. Influencia de quercetina y sus derivados metilados en la expresión del gen *let-767*.

5.2.2. ESTRÉS TÉRMICO

El objetivo de este ensayo era comprobar si los nematodos previamente cultivados en presencia de los distintos flavonoles mejoraban su resistencia frente al estrés térmico. Se realizaron estudios preliminares sometiendo los gusanos a temperaturas de 35 °C y 37 °C durante 8 h, comprobando que este último tratamiento era demasiado drástico y producía la muerte de todos los gusanos durante el primer día de adultos tanto en los ensayos control (gusanos no pre-tratados con flavonoles) como en los pre-tratados con los diferentes flavonoles. Por ello, los estudios posteriores se realizaron a una temperatura de 35 °C.

El estudio de la influencia del estrés térmico sobre la viabilidad del gusano se llevó a cabo en dos estados de desarrollo: primer día y sexto día de adulto, (ver sección de Materiales y Métodos, apartado 3.2.6). En el primer caso los nematodos eran cultivados en medio NGM que contenía los flavonoles (quercetina o sus derivados metilados en concentraciones de 200 μ M) desde que entraban en la fase L1 hasta alcanzar el primer día de adulto joven (estado posterior al larvario L4), en el cual eran sometidos a una temperatura de 35 °C durante 8 h. En el segundo caso los gusanos permanecían en las placas en presencia de los distintos flavonoles desde el estado larvario L1 hasta completar todo su periodo reproductivo (un total de 9 días), al fin del cual (sexto día de adulto) eran sometidos al estrés térmico.

La Figura V.4 muestra los porcentajes de supervivencia de los gusanos tras ser sometidos a estrés térmico en los diferentes ensayos realizados. En todos los casos, la exposición previa a los flavonoles aumentaba significativamente la termorresistencia de *C. elegans* con respecto a los animales sin tratar. En el caso de los gusanos jóvenes, el mayor efecto protector era observado en los gusanos tratados con quercetina, que aumentaba significativamente ($p < 0,05$) las tasas de supervivencia de los gusanos un 17% con respecto al control. Los tratamientos con los derivados metilados de quercetina aumentaban ligeramente la termorresistencia, entre un 5 y 7%, respectivamente, sin que se encontraran diferencias significativas entre ellos.

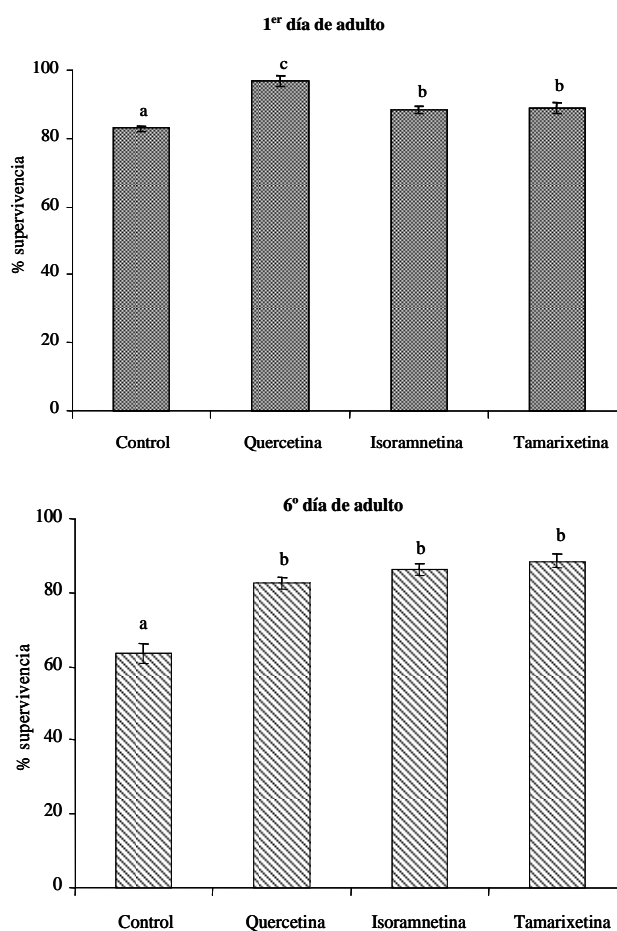


Figura V.4. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sanos sometidos a estrés térmico (35 °C, 8h) en el primer y sexto día de adulto tras pre-tratamiento con quercetina, isoramnetina o tamarixetina (200 μ M). Los resultados corresponden en cada caso a la media de tres ensayos independientes.

Como se puede observar en la Fig. V.4 la tasa de supervivencia era mayor en los gusanos sometidos a estrés en el 6º día de adulto que en los sometidos en el primer día

(mantenidos, en definitiva, menor tiempo en presencia de los flavonoles). En ese caso, la supervivencia media aumentaba con relación a los controles un 30% (quercetina), 35% (isoramnetina) y 39% (tamarixetina), aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p < 0,05$). En un estudio anterior, Piestch *et al.* (2009) encontraron que el pre-tratamiento con quercetina (200 μM) mejoraba la tolerancia térmica de los nematodos sometidos a estrés (35 °C, 8 h) en el 6° día de adulto, aunque la eficacia observada (un aumento de 10% en la tasa de supervivencia) era inferior a la encontrada en nuestro estudio. Una mejora de la resistencia al estrés térmico inducida por diferentes flavonoles como quercetina, kaempferol, fisetina, o quercetina 3-O-rutinósido fue también descrita por Kampkötter *et al.* (2007a,b). Otros autores también encontraron que el tratamiento con extractos vegetales ricos en flavonoides, como los obtenidos de *Ginkgo biloba* y arándanos, mejoraban la resistencia al estrés térmico alrededor de un 25% (Wu *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2006).

Una de las principales causas de la toxicidad en el estrés térmico es presumiblemente la elevada generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha observado que la acumulación de estas especies va aumentando en el interior del gusano a medida que lo hace el tiempo de exposición al estrés térmico. Diversos estudios han sugerido que gusanos tratados previamente con flavonoles, como quercetina, kaempferol, fisetina, o quercetina 3-O-rutinósido, al ser sometidos a estrés térmico eran capaces de atenuar la acumulación de ROS, relacionando este hecho con la actividad antioxidante que presentan esos compuestos (Kampkötter *et al.*, 2007a,b). Se ha visto que la resistencia al estrés térmico se manifiesta en gran parte por la síntesis de las proteínas de "shock" térmico (HSPs) (Parsell y Lindquist, 1994), ya que los genes que regulan la respuesta al estrés oxidativo son, en muchos casos y de forma coordinada, expresados junto con los genes de las proteínas anteriores. Lithgow *et al.* (1995) demostraron que los procesos que confieren un aumento en la termotolerancia resultaban de mutaciones en los genes *age-1*, *daf-2*, *daf-4*, *daf-7* y *spe-26*. También estos mismos autores encontraron una relación entre el fenotipo de la respuesta al estrés térmico con la longevidad en *C. elegans*, justificando que los animales que presentaban una mayor vida podían tener mayor tolerancia al mismo, debido a que inducían los genes de las proteínas HSP. Estos datos también fueron confirmados por Wilson *et al.* (2006), constataron una menor expresión de estos genes en gusanos que eran tratados con un extracto de arándanos rico en flavonoides, lo que indicaba un efecto protector de este tipo de compuestos; además se observaba un retraso en la aparición de las características morfológicas típicas del envejecimiento del gusano.

5.2.3. ESTRÉS OXIDATIVO

Se realizaron ensayos para determinar si los flavanoles (quercetina, isoramnetina o tamarixetina) modificaban la resistencia de *C. elegans* al estrés oxidativo. Como agente de estrés se utilizó juglona (150 μ M), a la cual se exponían los gusanos previamente cultivados en presencia de cada uno de los diferentes flavonoles; la duración del tratamiento con juglona fue en todos los ensayos de 24 h. Previamente se habían realizado ensayos para decidir el tiempo de exposición a este agente, observando que tiempos inferiores a 8 h no alteraban la viabilidad de los gusanos. Para evaluar si distintas etapas de desarrollo mostraban alguna influencia en la resistencia frente a estrés oxidativo, estos ensayos se llevaron a cabo en dos momentos de desarrollo (1^{er} y 6^o día de adulto), del modo en que se describe en el apartado 3.2.7 de la sección de Materiales y Métodos. Paralelamente, se realizaron ensayos control en gusanos no pre-tratados con flavonoles.

Como se puede observar en la Figura V.5, el tratamiento con los distintos flavonoles aumentaba significativamente su supervivencia con respecto al control cuando el estrés se aplicaba en el primer día de adulto. El compuesto que produjo mayor protección fue quercetina, que aumentaba significativamente la tasa de supervivencia alrededor de un 12%. El tratamiento con los dos derivados metilados de quercetina también mejoraba la resistencia al estrés oxidativo, con un aumento en la tasa de supervivencia en torno al 9%, sin que se observaran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos, aunque sí con relación a quercetina y control. Cuando los gusanos eran sometidos a estrés oxidativo en el sexto día de adulto se encontraba un comportamiento diferente en el caso de los metilados de quercetina, ya que mientras tamarixetina no ejercía un efecto protector, isoramnetina sí lo hacía, aumentando la tasa de supervivencia en proporción similar a quercetina (alrededor del 15% con respecto a los controles).

El efecto protector que ejerce la quercetina en los gusanos frente a estrés oxidativo fue también observado por Kampkötter *et al.* (2008), en ensayos llevados a cabo en medio líquido. Efectos similares fueron también encontrados en gusanos tratados con un extracto de *Ginkgo biloba* que contenía quercetina y tamarixetina, que aumentaba un 33% la resistencia al estrés oxidativo inducido por juglona (472 μ M) (Wu *et al.* 2002). Otros flavonoles como kaempferol o fisetina se mostraron igualmente eficaces en mejorar la resistencia frente a estrés oxidativo (Kampkötter *et al.*, 2007c).

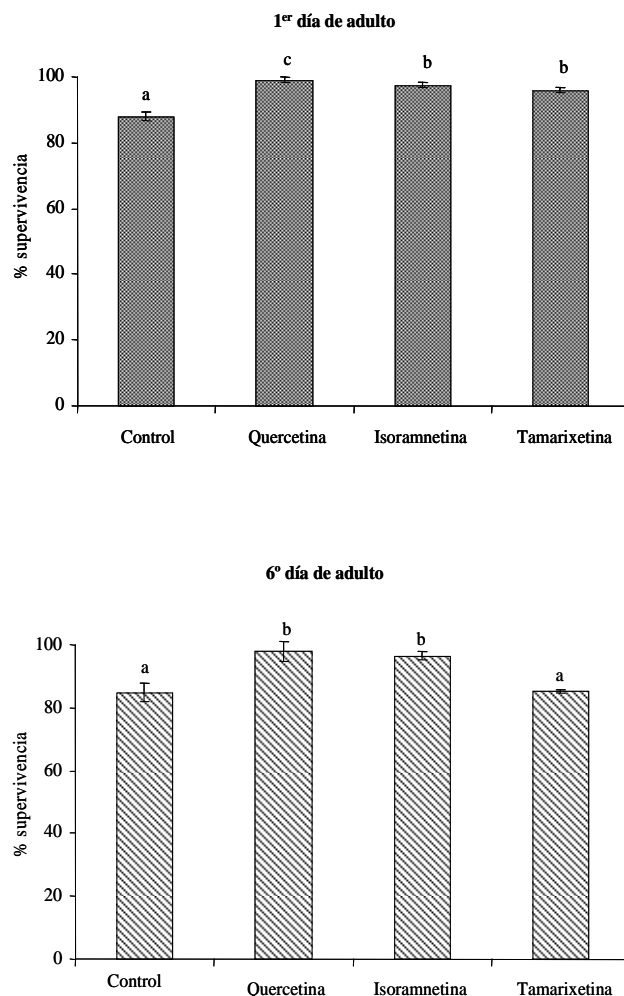


Figura V.5. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sanos sometidos a estrés oxidativo inducido por juglona (150 μ M, 24 h, 20 °C) en el primer y sexto día de adulto tras pre-tratamiento con quercetina, isoramnetina o tamarixetina (200 μ M). Los resultados corresponden en cada caso a la media de tres ensayos independientes.

Con el objeto de confirmar si los flavonoles ensayados modificaban el estatus oxidativo del gusano se realizó un ensayo utilizando el kit comercial OxyBlot™ (ver apartado 3.2.14 en Materiales y Métodos). Este test evalúa la oxidación de proteínas en el sistema biológico mediante inmunodetección de los grupos carbonilos introducidos en las cadenas laterales de las mismas como consecuencia de la oxidación llevada a cabo por especies reactivas de oxígeno (ROS) y otras especies reactivas, lo que es considerado una marca característica del estado de oxidación de dichas proteínas. La Figura V.6 muestra que los gusanos tratados con flavonoles presentaban una marcada disminución en la oxidación de las proteínas con respecto

a los animales sin tratamiento. Además, las bandas de los gusanos tratados con quercetina mostraban una menor densidad que las correspondiente a los ensayos realizados con sus metilados conjugados. Estos resultados confirmaban que los flavonoles ensayados, y sobre todo quercetina, efectivamente ejercían protección antioxidante en el gusano.

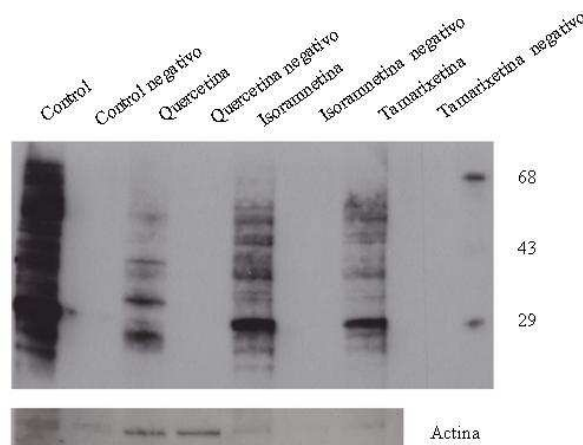


Figura V.6. Influencia de quercetina, isorramnetina y tamarixetina sobre la oxidación de proteínas en *C. elegans* evaluada por el kit OxyBlot™.

Se ha sugerido que los efectos protectores de los flavonoides tanto frente a estrés oxidativo como térmico en *C. elegans* podrían estar relacionados con su capacidad para disminuir la acumulación intracelular de ROS junto con una inhibición (down-regulation) de la actividad de catalasas (Smith y Luo, 2003; Wilson *et al.*, 2006; Kampkötter *et al.*, 2007a). En estudios previos de nuestro grupo (Dueñas *et al.*, 2010) se encontró que quercetina y sus derivados metilados se comportaban como mejores antioxidantes y captadores de radicales libres en sistemas *in vitro* que reconocidos antioxidante como α -tocoferol. Igualmente, se observó que la metilación reducía la capacidad antioxidante de quercetina. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en los estudios con *C. elegans*, por lo que no se puede descartar que los efectos protectores encontrados pudieran estar relacionados con una actividad antioxidante/antirradicalaria directa de los compuestos ensayados. También se sabe que la quercetina y otros flavonoides son capaces de actuar como pro-oxidantes en situaciones *in vivo* (Halliwell, 2008). Aunque la actividad pro-oxidante se considera en principio un efecto tóxico, en la práctica un ligero efecto pro-oxidante podría también resultar beneficioso, ya que la existencia de un grado bajo de oxidación podría “retardar” las defensas antioxidantes de un organismo y aumentar la expresión y actividad de los sistemas enzimáticos responsables de la metabolización de xenobióticos, dando como

resultado global una mayor citoprotección (Halliwell, 2008; Tang y Halliwell, 2010). Ciertamente las concentraciones de flavonoles empleadas en los medios de cultivo de *C. elegans* en nuestros ensayos (200 μ M) son superiores a las que pueden esperarse en plasma o tejidos humanos (intervalo nano a micromolar) (Spencer *et al.*, 2008; Loke *et al.*, 2009). Sin embargo, desconocemos la extensión en la que estos compuestos son incorporados por los gusanos, que podrían ser bajas o insuficientes para ejercer efectos pro-oxidantes tóxicos, pero quizás no para inducir una respuesta antioxidante metabólica. Tampoco se puede pasar por alto que los compuestos eventualmente incorporados por el gusano pueden ser biotransformados hacia metabolitos con diferente actividad biológica a la de los flavonoles originales. Será, por tanto, necesario profundizar más en los procesos de captación de los flavonoles por el gusano y en los mecanismos celulares y moleculares finalmente implicados en los efectos protectores frente a estrés oxidativo observados.

5.2.4. LONGEVIDAD

En estos ensayos, gusanos sincronizados en estado larvario L1 eran transferidos a placas suplementadas con los distintos flavonoles hasta alcanzar el estado larvario L4. Una vez alcanzado este estado se transferían a placas nuevas también con los flavonoles y a partir de este momento se comenzaba el recuento de gusanos supervivientes, tal y como se describe en el apartado 3.2.8 de la sección de Materiales y Métodos.

La Figura V.7 muestra las curvas de supervivencia de los gusanos tratados con quercetina, isoramnetina y tamarixetina comparadas con los gusanos control (sin tratamiento). Se puede observar que en una primera etapa (durante el periodo reproductivo, hasta el séptimo día de desarrollo), la tasa de gusanos muertos era más alta en los gusanos cultivados en presencia de flavonoles que en los controles. Sin embargo, en etapas posteriores del desarrollo del gusano este efecto se invertía produciéndose un aumento significativo en la longevidad del animal en presencia de los compuestos. Podría considerarse que inicialmente los flavonoles ejercían un ligero efecto perjudicial en el gusano, que se anulaba después de un periodo de adaptación del gusano en el tratamiento con flavonoles.

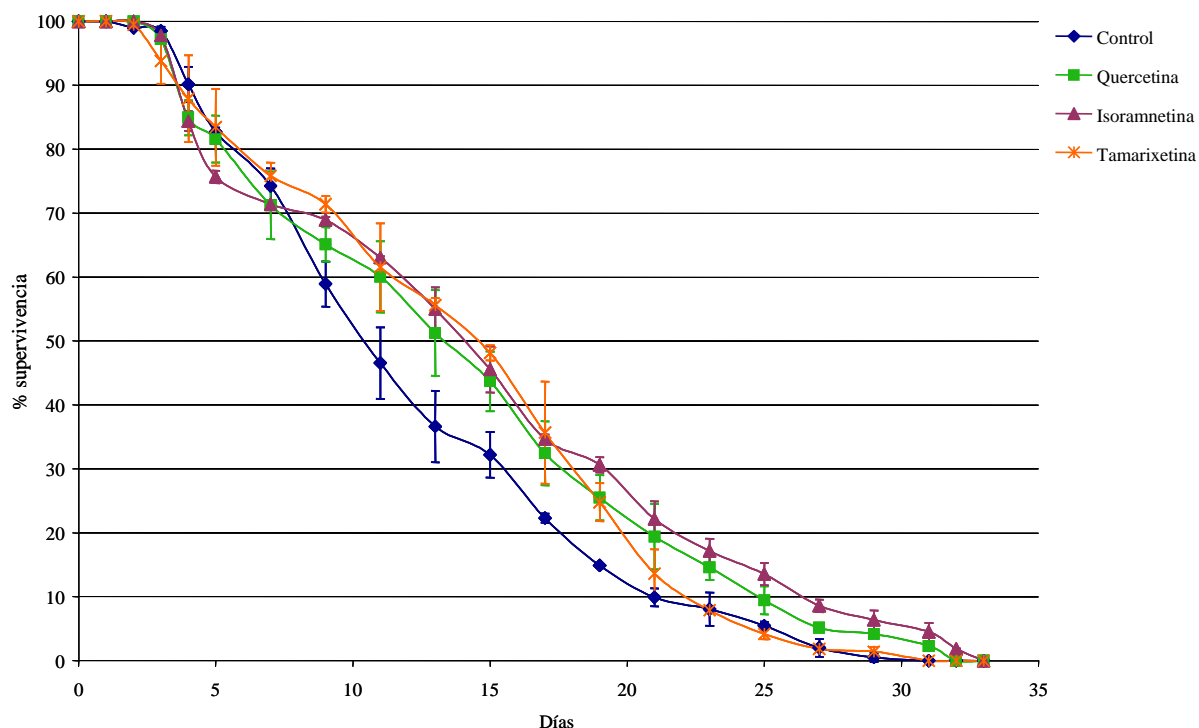


Figura V.7. Curvas de supervivencia de *C. elegans* cultivados en presencia y ausencia (control) de flavonoles.

En la Tabla V.1 se recogen los datos de vida media y máxima calculados según el análisis estadístico de Kaplan-Meier. También se refleja en esta tabla otra forma de calcular el tiempo de vida máxima como el promedio de duración de vida del 10% de la población más longeva. Todos los tratamientos aumentaban significativamente ($p < 0,05$) la vida media de los gusanos adultos. Los tratamientos con quercetina y tamarixetina alargaban la vida media del animal alrededor de un 11% con respecto al control, siendo la isoramnetina la que aportaba una mayor extensión en la vida media del nematodo (aproximadamente un 16% en relación al control). También es el tratamiento con este flavonol el que aportaba una mayor extensión en la vida máxima del nematodo calculado como la media del 10% de la población más longeva. El test estadístico *log-rank* indicaba que todos los tratamientos mostraban diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

Tabla V.1. Influencia de quercetina, isoramnetina y tamarixetina (200 μ M) sobre la duración de vida de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento a 20 °C.

Tratamiento	Promedio (días)	Mediana (días)	Máximo (días)	Máximo 10% ^a (días)	p vs control (log-rank)
Control	15,7 \pm 0,5	14,0 \pm 0,6	34	29,3 \pm 0,9	
Quercetina	17,4 \pm 0,5	18,0 \pm 0,8	36	30,8 \pm 2,1	0,008
Isoramnetina	18,2 \pm 0,5	18,0 \pm 0,7	36	34,0 \pm 0,6	0,000
Tamarixetina	17,5 \pm 0,5	18,0 \pm 0,7	34	28,7 \pm 0,5	0,021

*Media \pm desviación estándar (n=3). ^aMáximo 10% = Tiempo promedio de vida máximo del 10% de la población más longeva. El test *log-rank* indica las diferencias en la vida media de un tratamiento con respecto al control ($p < 0,05$).

Diversos autores han estudiado también la influencia de diferentes flavonoles sobre la longevidad de *C. elegans*, existiendo discrepancias entre los resultados obtenidos. Wu *et al.* (2002) observaron que la tamarixetina aumentaba la vida media de los gusanos en un 25%, mientras que los tratamientos con quercetina y kaempferol no prolongaban la vida media del nematodo con respecto a los gusanos sin tratar. El tratamiento llevado a cabo en dicho estudio era a partir de gusanos en estado larvario L4, a diferencia del realizado en nuestro trabajo, donde la exposición a los flavonoles se realizaba desde el estado larvario L1. Kampkötter *et al.* (2008) también mostraron que la quercetina en concentración 100 μ M en los medios de cultivo aumentaba la vida media y máxima de *C. elegans* en un 19% y 15%, respectivamente, aunque esos estudios fueron realizados en medio líquido, lo que no permite una comparación completa con los realizados por nosotros. En un estudio llevado a cabo por Piestch *et al.* (2009) con diferentes concentraciones de quercetina entre 100 y 200 μ M se observó una extensión de la vida media de los nematodos en un 21%, obteniendo los mejores resultados a una concentración de 200 μ M. Igualmente Wilson *et al.* (2006) encontraron que el tratamiento con un extracto de arándanos a una concentración de 200 μ g/mL prolongaba la vida media y máxima de *C. elegans* en un 28% y 14%, respectivamente. Los diferentes resultados obtenidos en los ensayos de longevidad han sido interpretados por algunos autores (Gems, 2000; Gruber *et al.*, 2009) como posiblemente debidos a la falta de homogeneidad entre los estudios desarrollados en diferentes laboratorios en relación con las condiciones de cultivo de

los gusanos, como por ejemplo la fuente de alimento y la manipulación de dichos animales.

Las rutas que participan en los procesos de longevidad podrían ser modificadas por cambios en la expresión de genes (Braeckman y Vanfleteren, 2007). Todos los mutantes de longevidad que han sido probados hasta el momento muestran también un aumento en la resistencia al estrés. En particular, los mutantes de larga-vida tienen afectada la ruta IGF/insulina, y las mutaciones que afectan a la formación de la línea germinal dan lugar a gusanos tanto termotolerantes como de larga vida (Muñoz *et al.*, 2003). En diversos trabajos se ha identificado el factor de transcripción DAF-16 en *C. elegans*, homólogo a la familia FoxO de los humanos, como un regulador clave en la longevidad y resistencia al estrés oxidativo y térmico (Kampkötter *et al.*, 2007a; Saul *et al.*, 2008; Kawasaki *et al.*, 2009; Pietsch *et al.*, 2009). La distribución subcelular de este factor de transcripción así como su activación son regulados por diversas rutas de señalización en *C. elegans*, como son las de la IGF/insulina, c-Jun N-terminal quinasa (JNK1), LIN-14, RAS o SIR2-1, las neuronas sensoriales de señalización o la ruta de señalización de la línea germinal (Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Braeckman y Vanfleteren, 2007; Houthoofd y Vanfleteren, 2007). Kampkötter *et al.* (2007a, 2008) observaron que el tratamiento con quercetina daba lugar a una translocación del factor de transcripción DAF-16 del citoplasma al núcleo, lo cual podría estar relacionado con el aumento en la respuesta al estrés y a la longevidad. La observación anterior se apoya en los estudios de Lin *et al.* (2001) con mutantes que tenían suprimido el gen *daf-16*, los cuales mostraban una disminución en la longevidad. Sin embargo, Pietsch *et al.* (2009) realizaron un estudio con diferentes mutantes en genes involucrados en rutas de estrés y/o longevidad de *C. elegans*, obteniendo resultados distintos a los observados por Kampkötter *et al.* (2007a, 2008). Este trabajo mostró que el gen *daf-16* no era esencial para la regulación de la longevidad después del tratamiento con quercetina, aunque curiosamente los genes *age-1* y *daf-2*, siendo claves en la ruta de señalización de la insulina/IGF-I, sí estarían vinculados con la extensión de la longevidad mediada por quercetina.

5.2.5. CAPTACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE FLAVONOLES POR *C. elegans*

Se realizaron ensayos para establecer si los flavonoles eran captados y eventualmente metabolizados por *C. elegans*. Era también importante descartar que las bacterias empleadas como alimento del gusano tuvieran un papel en la incorporación y metabolismo de los compuestos, por lo que estos ensayos se realizaron

con bacterias muertas, una vez comprobado que este hecho no afectaba al desarrollo del nematodo (ver apartado de ensayos preliminares).

Para este estudio los gusanos se incubaron a 20 °C en placas que contenían los distintos flavonoles y al cabo de 4-6 días eran recogidos y homogeneizados en metanol, como se describe en la sección de Materiales y Métodos (apartado 3.2.9). El análisis por HPLC de los extractos de homogenizados de gusanos (Figura V.8) permitió confirmar la incorporación de los compuestos ensayados por parte del gusano, así como la formación de nuevos metabolitos resultantes de su biotransformación. En la tabla V.2 se resumen los resultados de los análisis de HPLC-DAD-ESI/MS en los ensayos realizados con los distintos flavonoles, recogiendo la identificación tentativa de los metabolitos detectados.

En el ensayo llevado a cabo con quercetina (Figura V.8A), se detectaron nueve picos correspondientes a diversos metabolitos formados en el organismo del gusano relacionados con quercetina, identificados en función de sus espectros UV-Visible y confirmados por análisis de MS. Los picos 2, 4, 5 y 6 mostraban un espectro con un máximo de absorción a 354 nm, y en el análisis de espectrometría de masas se observó un ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 463, que daba lugar a un fragmento de m/z 301 (-162 amu, pérdida de un resto hexosa), correspondiente a quercetina, por lo tanto estos compuestos fueron identificados tentativamente como quercetina-monoglicósidos, donde el resto de azúcar correspondía a una hexosa. La identidad del pico 2 fue confirmada como quercetina 3-O-glucósido, por comparación de su tiempo de retención y características espectrales con un patrón comercial. Los picos 4, 5 y 6 corresponderían a monohexósidos en los que la sustitución del resto glicosídico se produciría sobre otras posiciones de la molécula de quercetina y/o el azúcar fuera diferente a glucosa.

Los picos 7, 8 y 9 mostraron un ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 543 que producía un fragmento de m/z 301, correspondiente a quercetina. La pérdida de -242 amu coincide con la debida a un resto hexosa (-162 amu) y otro de sulfato (-80 amu), lo que se confirmaba al realizar la detección en modo EPI (*enhanced product ion*), donde el ion padre de m/z 543 daba lugar a dos fragmentos de m/z 381 ($[M-162]^-$) y m/z 301 ($[M-162-80]^-$). La pérdida sucesiva de los restos de azúcar y de sulfato sugiere que cada uno está localizado en diferentes posiciones sobre la molécula de quercetina, aunque la información disponible no es suficiente para concluir acerca de las posiciones respectivas de sustitución. Estos metabolitos fueron, por tanto, identificados tentativamente como quercetin-sulfato-hexósidos.

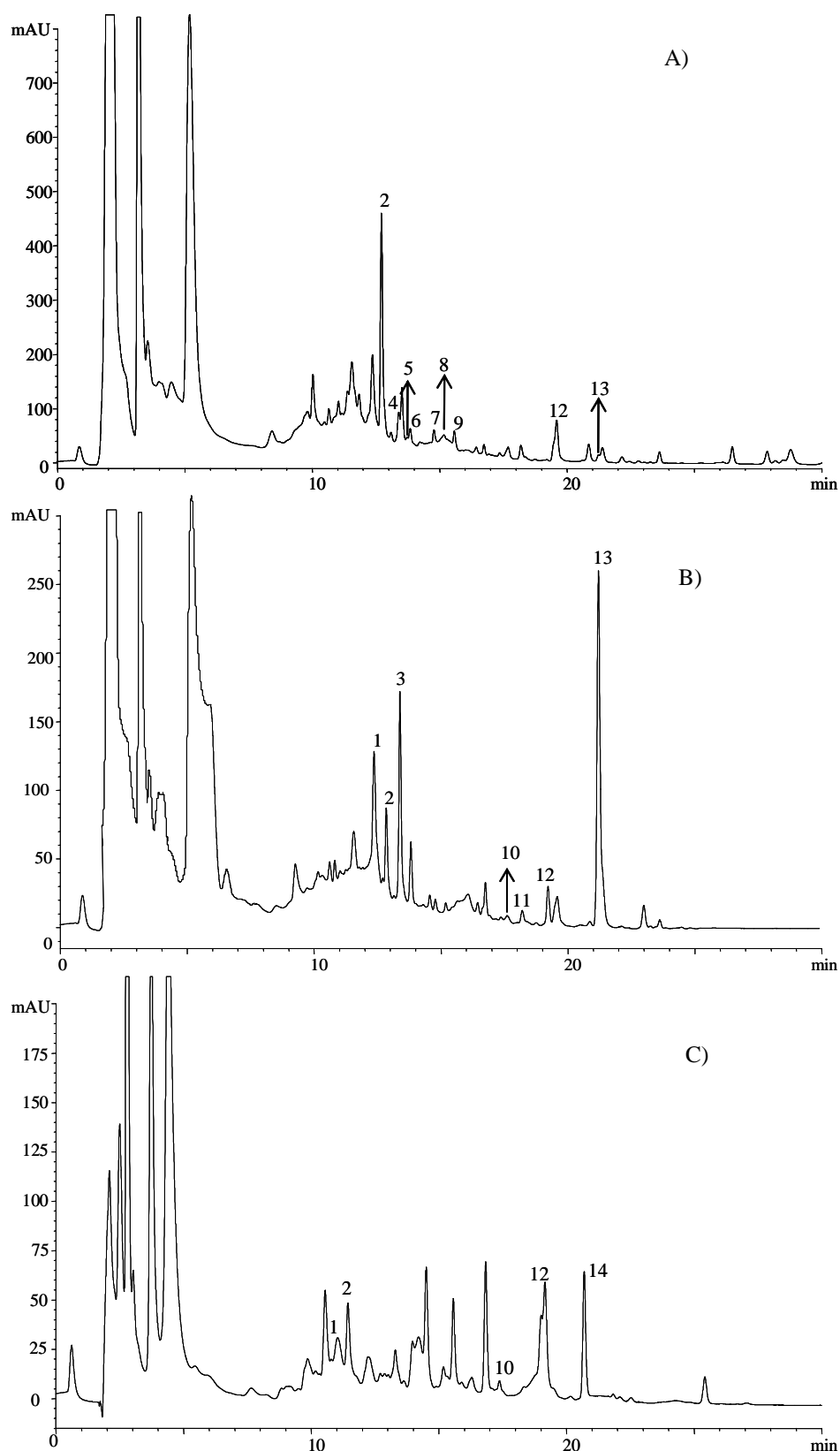


Figura V.8. Cromatogramas de HPLC registrados a 370 nm correspondientes a extractos obtenidos de homogeneizados de *C. elegans* previamente cultivados en presencia de: (A) quercetina, (B) isorhamnetina, (C) tamarixetina.

Las características cromatográficas y espectrales de los picos 12 y 13 coincidían con quercetina e isoramnetina, respectivamente, y esta identidad fue confirmada positivamente por comparación con patrones comerciales. La identificación de isoramnetina en gusanos no tratados con la misma sino sólo con quercetina sugiere la existencia de actividad metil-transferasa en el nematodo.

Por otra parte, en los ensayos realizados con isoramnetina y tamarixetina (picos 13 y 14), además de su detección en el gusano, en los cromatogramas (Figura V.8B y C y Tabla V.2) se observaba también la presencia de quercetina (pico 12), indicando la posible actividad desmetilante por *C. elegans*.

La formación de diversos derivados glicosilados en todos los tratamientos, parece sugerir que el gusano toma para la conjugación azúcares del medio procedentes seguramente de la hidrólisis de los polisacáridos del agar. Igualmente los restos sulfatos podrían provenir bien de sulfato de magnesio que se añade al medio de cultivo, bien de los polisacáridos sulfatados que contiene el agar.

Otros picos observados eran:

Pico 1, detectado en los extractos de los gusanos cultivados con los dos flavonoles metilados. Este compuesto presentaba un ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 693 y un fragmento de m/z 301 (quercetina). El análisis del ion de m/z 693 en modo EPI dio lugar a diferentes fragmentos de m/z 675 (-18 amu, pérdida de una molécula de H_2O), m/z 623 (-70 amu, posible pérdida de un resto de ácido pirúvico), m/z 381 (monosulfato de quercetina) y m/z 301, (quercetina). No existe una propuesta definitiva de identidad para este metabolito, donde la quercetina podría estar conjugada con ácido pirúvico y sulfato. De confirmarse esta posibilidad el ácido pirúvico podría provenir del agar, del cual es un componente minoritario, o de la glucosa (producto del ciclo de Krebs).

Pico 3, cuyo espectro UV presentaba λ_{max} a 355 nm, similar a quercetina-3-O-glucósido, pero que eluía con un tiempo de retención diferente. Este compuesto mostraba un ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 625, y un fragmento de m/z 301, correspondiente a la pérdida de dos restos de hexosa (-162-162 amu), por lo que fue tentativamente identificado como un dihexósido de quercetina.

Picos 10 y 11, con idéntico ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 557, que fueron identificados como dos metilquercetin-sulfato-hexósido, de acuerdo a sus características de fragmentación en modo EPI, con liberación de iones de m/z 395 (-162 amu, pérdida de un resto hexosa), m/z 315 (metilquercetina; -162-80 amu, pérdida de restos hexosa y sulfato) y m/z 301 (quercetina).

Tabla V.2. Características cromatográficas y espectrales e identificación tentativa de metabolitos en los ensayos realizados con los diferentes flavonoles

Pico	t _R (min)	λ _{max} (nm)	Ion precursor [M-H] ⁻	Fragmentos(m/z)	Identificación tentativa	Ensayo
1	12,3	355	693	675, 623, 381, 301	Derivado de quercetina sulfato	Is, Tm
2	12,7	355,2	463	301	Quercetina 3-O-glucósido	Q, Is, Tm
3	13,2	355,0	625	301	Quercetin dihexósido	Is
4	13,3	354,0	463	301	Quercetin monohexósido	Q
5	13,7	355,0	463	301	Quercetin monohexósido	Q
6	13,8	355,0	463	301	Quercetin monohexósido	Q
7	14,7	342,0	543	381, 301	Quercetin sulfato hexósido	Q
8	15,1	-	543	381, 301	Quercetin sulfato hexósido	Q
9	15,5	346,8	543	381, 301	Quercetin sulfato hexósido	Q
10	17,2	342	557	395, 315, 301	Metilquercetin sulfato hexósido	Is, Tm
11	17,5	344	557	395, 315, 301	Metilquercetin sulfato hexósido	Is
12	19,5	372,0	301	-	Quercetina	Q, Is, Tm
13	21,2	370,0	315	301	Isoramnetina	Q, Is
14	21,4	370,0	315	301	Tamarixetina	Tm

Q: Quercetina; Is: Isoramnetina; Tm: tamarixetina

Estos estudios permiten confirmar que los flavonoles son incorporados y biotransformados por *C. elegans*, dando lugar a la formación de nuevos metabolitos, particularmente formas glicosiladas y sulfatos. La existencia de las actividades enzimáticas glucosiltransferasa y sulfotransferasa se encuentra descrita en *C. elegans* (Sherman *et al.*, 2005; Berninsone *et al.*, 2006). Se sabe que este nematodo expresa glucosiltransferasas similares a las implicadas en las rutas de N y O-glicosilación en humanos. Las enzimas de tipo sulfotransferasa (SULT) son enzimas citosólicas que en humanos se han clasificado en seis familias. En la WormBase sólo se encuentra anotado para *C. elegans* un gen (ceST1) asociado a una sulfotransferasa, identificado en el clon Y113G7A.11 por Hattori *et al.* (2006). Según este mismo autor, esta enzima forma parte del sistema de defensa frente a xenobióticos del gusano y también puede regular la proliferación de las células germinales de *C. elegans*.

Con el objeto de tener una idea cuantitativa de la cantidad de flavonoles incorporados por *C. elegans* y poder comparar la captación de los mismos en los distintos ensayos, se procedió a cuantificar los compuestos encontrados en cada caso a partir de sus picos cromatográficos por comparación con rectas de calibrado obtenidas con patrones externos de quercetina, isoramnetina o tamarixetina según los casos. Los resultados se expresaron como concentraciones relativas referidas a proteínas totales del gusano (μg de compuesto / mg de proteína). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla V.3. Como se puede observar la capacidad de absorción por parte de nematodo es diferente dependiendo del tipo de flavonol ensayado. Aunque la concentración de quercetina cuantificada en los gusano ($19,85 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) era inferior a las de isoramnetina y tamarixetina ($48,80$ y $49,85 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, respectivamente) en sus ensayos respectivos, la suma de la concentración de quercetina más sus metabolitos cuantificables ($89,60 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) era más alta que la de isoramnetina o tamarixetina más sus metabolitos ($56,95$ o $52,95 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, respectivamente), sugiriendo que existía una mayor captación de quercetina por parte del gusano que de sus metabolitos metilados. Asimismo, parece que la quercetina es metabolizada por *C. elegans* hacia metabolitos conjugados en mayor extensión que isoramnetina o tamarixetina.

Tabla V.3. Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) de los flavonoles estudiados y sus metabolitos determinados en *C. elegans* cultivados en la presencia de quercetina, isoramnetina o tamarixetina ($200 \mu\text{M}$).

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	Ensayo		
	Quercetina	Isoramnetina	Tamarixetina
Quercetina	$19,85 \pm 2,05^*$	$1,95 \pm 0,35$	$3,10 \pm 0,42$
Isoramnetina	$15,95 \pm 2,47$	$48,80 \pm 5,83$	nd
Tamarixetina	nd	nd	$49,85 \pm 1,20$
Quercetina 3-O-glucósido	$33,90 \pm 2,83$	-	-
Otros quercetin monoglicósidos [†]	$19,90 \pm 2,55$	-	-
Quercetin diglicósido [†]	-	$6,20 \pm 1,55$	-
Total	89,60	56,95	52,95

nd: no detectado; [†]expresado como equivalentes de quercetina; *media \pm desviación estándar (n=3).

No es posible comparar estos datos sobre captación de flavonoles por *C. elegans* con otros estudios, ya que, en lo que nosotros conocemos, la única estimación de la incorporación de quercetina por parte del nematodo fue realizada por Kampkötter *et al.* (2008) y no es posible la comparación, ya que ese estudio fue realizado en medio líquido y los datos fueron expresados por número de gusanos (intervalo determinado: 0,04 a 0,12 nmol de quercetina por 1000 gusanos). En ese estudio tampoco se identificó la formación de ningún metabolito de quercetina.

5.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en estos estudios ponen de manifiesto que los tratamientos con quercetina ($200 \mu\text{M}$) inducen un aumento en el tamaño del gusano y en su capacidad reproductiva. Sin embargo, los derivados metilados de quercetina no ejercen ningún efecto en dichas características fenotípicas, con respecto a los gusanos no tratados con flavonoles. Los análisis por PCR en tiempo real para la cuantificación del ARNm de la enzima *LET-767*, que afecta al crecimiento, reproducción y desarrollo de *C. elegans*, no permitieron concluir si el aumento de la

capacidad reproductora que experimentaba el gusano en el tratamiento con quercetina estaba relacionado con el metabolismo estrogénico.

Los tratamientos con quercetina, isoramnetina y tamarixetina aumentan la resistencia de *C. elegans* frente a estrés térmico y oxidativo. En el primer día de adulto, es el tratamiento con quercetina el que produce un mayor efecto protector frente a ambos tipo de estrés, aumentando la tasa de supervivencia un 17 y 12%, respectivamente, con respecto al control.

El porcentaje de supervivencia de los gusanos tratados con flavonoles sometidos a estrés en el sexto día de adulto es superior que en los sometidos a estrés en el primer día de adulto. En esa etapa avanzada de desarrollo, los tratamientos tanto con quercetina como con sus derivados metilados mejoran la resistencia de los gusanos al aumento de temperatura, no mostrando diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, cuando se considera estrés oxidativo, la tamarixetina no ejerce ningún efecto protector frente a dicho tipo de estrés en los gusanos en el sexto día de adulto, al contrario de isoramnetina y quercetina que aumentan la tasa de supervivencia en un 15% con respecto al control.

En los gusanos tratados con los flavonoles ensayados se comprobó la existencia de una menor tasa de oxidación de proteínas mediante análisis OxyBlot™, siendo el tratamiento con quercetina, el más eficaz en este sentido. De este modo, los efectos protectores de los flavonoles ensayados frente al estrés oxidativo podrían estar, al menos en parte, relacionados con su capacidad antioxidante y captadora de radicales libres.

Los tratamientos con quercetina, isoramnetina y tamarixetina prolongan significativamente la vida media del gusano, siendo los gusanos tratados con isoramnetina la que aporta una mayor extensión en la vida media del gusano, con respecto al control.

Otro aspecto que pudo ser establecido es que los tres flavonoles estudiados son captados por el nematodo y parcialmente biotransformados a diferentes metabolitos glicosilados, sulfatados y metilados. La cuantificación de los niveles de los flavonoles y sus principales metabolitos sugería una mayor biodisponibilidad de quercetina que de sus derivados metilados.

En definitiva, los estudios realizados demuestran que tanto quercetina como sus metabolitos metilados son biodisponibles y poseen una actividad biológica relevante en un sistema *in vivo*, que redundará en una mayor protección frente a procesos oxidativos y mejora su tasa de supervivencia tanto en condiciones de estrés como normales de desarrollo. Son necesarios, sin embargo, más estudios para establecer de

manera definitiva los mecanismos moleculares de estos efectos, así como si los mismos podrían ser extrapolables a sistemas mamíferos, con vista a contribuir a explicar los potenciales efectos “saludables” de este tipo de polifenoles presentes en alimentos vegetales.

VI. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DE QUERCETINA-3-O-GLUCÓSIDO Y QUERCETINA SOBRE ESTRÉS OXIDATIVO, TERMOTOLERANCIA, LONGEVIDAD Y BIODISPONIBILIDAD EN *Caenorhabditis elegans*.

6.1. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides están presentes en cantidades apreciables en múltiples alimentos y forman parte de nuestra dieta habitual, destacando los flavonoles como la clase más extendida en los alimentos. La forma habitual en que se encuentran en la naturaleza estos compuestos es en combinación con azúcares, usualmente como O-heterósidos. Los azúcares que intervienen más frecuentemente son hexosas (glucosas y galactosa), metilpentosas (ramnosa), pentosas (arabinosa y xilosa) y ácidos urónicos (glucurónico y galacturónico). La unión se suele realizar entre el carbono 1 del azúcar y el oxígeno en la posición 3 del aglicón y alternativamente en la posición 7, aunque también se pueden encontrar glicósidos en cualquiera de los otros hidroxilos de la estructura flavonoide. Los flavonoles se encuentran ampliamente extendidos en frutas y hortalizas de consumo habitual, habiéndose estimado su ingesta dietética media en 20-35 mg/día (Manach *et al.*, 2004), pero existen amplias variaciones interindividuales y entre poblaciones en cuanto a cantidad y tipo de flavonoides consumidos en función de los hábitos dietéticos (Arst *et al.*, 2001; de Pascual-Teresa *et al.*, 2001).

La mayor parte de la evidencia sobre los potenciales efectos biológicos de los flavonoides deriva de estudios epidemiológicos y de ensayos *in vitro*. Debido a su ubicua presencia en la dieta, la quercetina es el compuesto más comúnmente utilizado en estudios de biodisponibilidad y actividad de flavonoides. Muchos de estos estudios se han realizado empleando quercetina aglicón, aunque también con algunos de sus derivados glicosilados disponibles comercialmente. En general, en estudios *in vitro* se ha observado que la glicosilación afecta significativamente a las propiedades antioxidantes de los flavonoides, siendo más activos los aglicones que las formas glicosiladas (Rice-Evans *et al.*, 1996; Hopia y Heinonen, 1999).

Los estudios sobre actividad biológica de flavonoles realizados utilizando *C. elegans* como organismo modelo se han centrado principalmente en quercetina y se refieren sobre todo a longevidad y resistencia frente a estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2006; Kaempköter *et al.*, 2007a, b y c, 2008; Piestch *et al.*, 2009; Saul *et al.*, 2008), como ya se discutió en el capítulo anterior. Según nuestro conocimiento, hay pocos trabajos realizados con glicósidos de quercetina, en particular, cabe señalar uno llevado a cabo con quercetina 3-O-rutinósido, donde se compara la respuesta del nematodo expuesto a este compuesto y a quercetina frente a estrés térmico y oxidativo (Kampkötter *et al.*, 2007a). En ese estudio se encontró que, aunque los dos compuestos eran capaces de reducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno, el compuesto glicosilado no ejercía un efecto protector destacable frente a estrés oxidativo y térmico, al contrario que el aglicón, que se mostraba muy eficaz en este sentido. Recientemente, Xue *et al.* (2011) han estudiado los efectos de los

compuestos quercetina 3'-O-glucosa y quercetina 3-O-glucosa-(4→1)-glucosa, aislados de cebolla, sobre la longevidad del nematodo. Estos autores encontraron que el compuesto diglicosilado prolongaba más la vida media del gusano, no encontrando una asociación directa entre el aumento en la longevidad y la actividad antioxidante

En el organismo humano, la quercetina en su forma aglicón muestra una tasa de absorción relativamente alta (10-50%) (Hollman *et al.*, 1996); sin embargo, en los vegetales se encuentra de manera casi exclusiva en forma de diversos glicósidos, que no se ven afectados en gran medida por el procesado industrial o doméstico de los productos (Price *et al.*, 1998). Se sabe que algunos de estos glicósidos pueden ser desconjugados por β -glicosidasas epiteliales del cepillo intestinal, como la lactasa-florizin hidrolasa (LPH), y la β -glicosidasa citosólica (CBG) en enterocito, liberando quercetina, que podría luego ser absorbida (Day *et al.*, 1998; Day *et al.*, 2000; Nemeth *et al.*, 2003). Por otra parte, la absorción de algunos glicósidos particulares de quercetina podría también tener lugar por medio de transportadores de membrana como el transportador de glucosa sodio-dependiente-1 (SGLT-1) seguido de una posterior desglicosilación ya en el interior del enterocito (Hollman *et al.*, 1999; Ader *et al.*, 2001; Wolfram *et al.*, 2002). En cualquier caso, una vez absorbida, la quercetina se metaboliza rápidamente ya en enterocitos y adicionalmente en hígado, mediante UDP-glucuronil-transferasas, sulfotransferasas y metiltransferasas, formando diversos conjugados glucurónidos, sulfatos y metilados, que son los que van a encontrarse en circulación sistémica (Day *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2001; Witting *et al.*, 2001; Mullen *et al.*, 2002).

En lo que nosotros conocemos, no existen datos sobre captación y metabolismo de glicósidos de flavonoles por *C. elegans*. El único estudio donde se realizó una estimación sobre la incorporación de quercetina por parte del nematodo fue llevado por Kampkötter *et al.* (2008), en medio líquido y empleando exclusivamente el aglicón.

Teniendo en cuenta que los glicósidos de flavonoles constituyen la forma mayoritaria en los alimentos, en este capítulo nos planteamos como objetivo estudiar la biodisponibilidad en *C. elegans* de quercetina 3-O-glucósido (Q3G, Figura VI.1), derivado mayoritario de quercetina en la dieta, así como evaluar sus efectos sobre las características fenotípicas, resistencia a estrés oxidativo y térmico, y longevidad en el gusano, comparando estos efectos con los del aglicón.

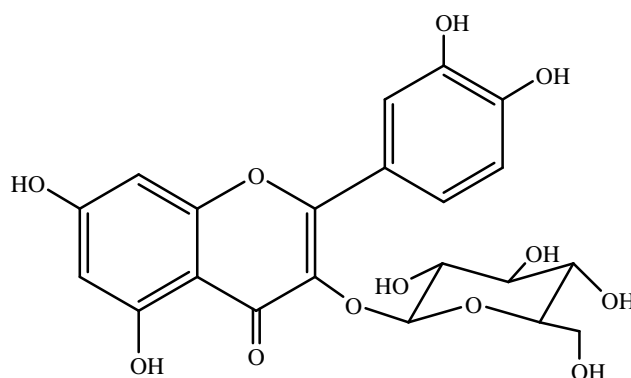


Figura VI.1. Estructura de quercetina 3-O-glucósido.

6. 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1. CAPTACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE QUERCETINA 3-O-GLUCÓSIDO POR *C. elegans*

Los gusanos se incubaron a 20 °C en placas que contenían Q3G a distintas concentraciones (10 a 200 μ M), usando como fuente de alimento bacterias muertas para descartar la posible influencia de éstas sobre los procesos estudiados. Los gusanos se recogieron al cabo de 4-6 días y se homogenizaron en metanol, como se describe en la sección de Materiales y Métodos (apartado 3.2.9). El análisis por HPLC de los extractos de homogenizados de gusanos (Figura VI.1) permitió confirmar que el gusano incorporaba y biotransformaba el compuesto. En la tabla VI.1 se resumen los resultados obtenidos en los análisis de HPLC-DAD-ESI/MS relativos a los picos correspondientes a Q3G y posibles metabolitos relacionados, así como las identidades establecidas para los mismos, en función de sus características de masas.

El pico 1 mostraba un espectro con un máximo de absorción a 354 nm, similar a quercetina -3-O-glucósido, pero eluía con un tiempo de retención diferente. En el análisis de espectrometría de masas se observó un ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 625, y dos fragmentos de m/z 463 y m/z 301, correspondientes a la pérdida sucesiva de los dos restos hexosa (-162 amu). El hecho de que estos restos se pierdan consecutivamente sugiere que cada hexosa está localizada en diferente posición sobre la molécula de quercetina y no constituyendo un disacárido, aunque los datos

disponibles no permiten concluir sobre las posiciones respectivas de sustitución, por lo que el compuesto sólo puede ser identificado tentativamente como un dihexósido de quercetina.

El pico 2 presentaba un ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 705, que producía tres fragmentos de m/z 543 (-162 amu, pérdida de un resto hexosa); m/z 463, correspondiente a la pérdida del resto hexosa (-162 amu) y de otro sulfato (-80 amu), y m/z 301 (quercetina), derivado de la pérdida de dos restos hexosa y uno sulfato. Ello permitía identificar tentativamente el compuesto como un quercetin-sulfato-dihexósido, en el cual cada hexosa estaría en posiciones diferentes sobre la molécula de quercetina, pero sin que se pudiese establecer las mismas.

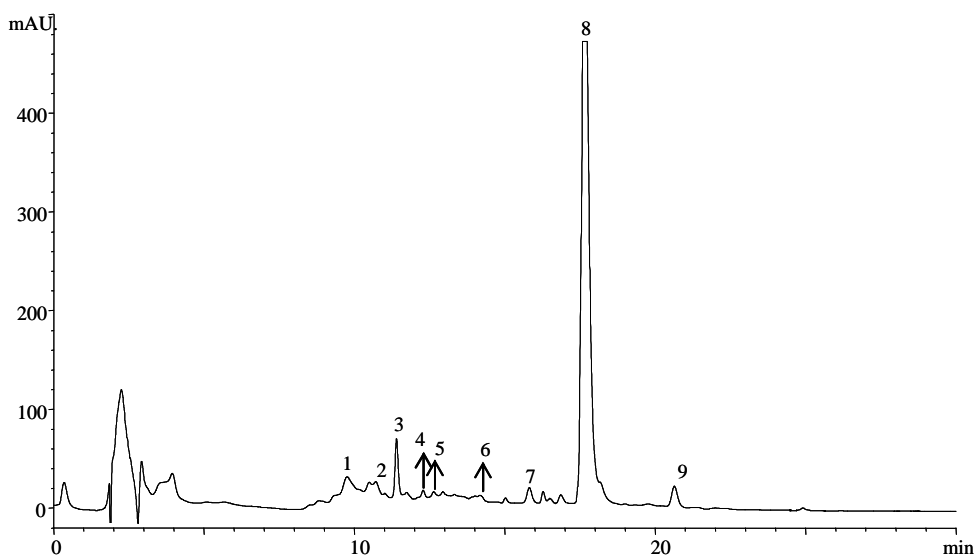


Figura VI.2. Cromatograma de HPLC registrado a 370 nm correspondiente al extracto obtenido de homogenizado de *C. elegans* previamente cultivado en presencia de quercetina 3-O-glucósido 200 μ M.

Los picos 3, 4 y 5 mostraban espectros UV y de masas similares, pero diferentes tiempos retención. De ellos, se pudo identificar inequívocamente el pico 3 como quercetina 3-O-glucósido por comparación con el patrón, mientras que los otros dos sólo podían ser asociados a otros quercetin-monohexósidos, posiblemente glucósidos,

en distintas posiciones de sustitución sobre el aglicón, aunque también podría tratarse de glicósidos donde el azúcar fuera diferente a la glucosa.

Los picos 6 y 7 mostraban un ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 543 que daba lugar dos fragmentos de m/z 381 y m/z 301, coherentes con la pérdida sucesiva de un resto hexosa y de otro sulfato unidos a una molécula de quercetina, lo que permitía asociarlos como dos quercetin-sulfato-hexósido. Al igual que en los casos anteriores, las pérdidas sucesivas de los restos hexosa y sulfato indican que cada uno se encuentra localizado en diferentes posiciones sobre la molécula de quercetina, aunque no es posible asignar las posiciones respectivas de sustitución.

La identidad de los picos 8 y 9 fue confirmada como quercetina e isoramnetina, respectivamente, por comparación de sus características cromatográficas y espectrales con patrones comerciales. La identificación de quercetina e isoramnetina en el gusano indica la existencia de actividades desglucosilante y metil-transferasa por parte del nematodo. Esta última también fue concluida al estudiar el metabolismo de quercetina (apartado 5.2.5 del capítulo anterior). Por otra parte, la identificación de quercetin monohexósidos diferentes a Q3G indica la conjugación de quercetina previamente liberada por desglucosidación de Q3G y, por tanto, la existencia en el gusano de actividad enzimática glicosilante.

Al igual que en los ensayos con quercetina y derivados metilados (apartado 5.2.5), también con Q3G se encuentra la formación de nuevos derivados glicosilados así como de metabolitos sulfatados. Ello nuevamente indica que el gusano capta azúcares del medio, procedentes posiblemente de la hidrólisis de los polisacáridos del agar. La existencia de α -glucosidasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucósidicos α -1,4- y α -1,6 se encuentra descrita en *C. elegans*, (Sikora *et al.*, 2010), lo que justificaría la disponibilidad de glucosa y su uso como azúcar en los procesos de conjugación de quercetina. Igualmente los restos sulfato podría proceder de la hidrólisis de polisacáridos sulfatados o del sulfato de magnesio adicionado al medio, como ya se ha comentado en el capítulo anterior (apartado 5.2.5).

Tabla VI.1. Características cromatográficas y espectrales e identificación tentativa de metabolitos en los ensayos realizados con quercetina 3-O-glucósido

Pico	t_R (min)	λ_{max} (nm)	Ion precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)	Identificación tentativa
1	10,8	353	625	463, 301	Quercetina dihexósido
2	12,3	354	705	543, 463, 301	Quercetina sulfato dihexósido
3	12,7	354	463	301	Quercetina 3-O-glucósido
4	13,3	351	463	301	Quercetina monohexósido
5	13,8	354	463	301	Quercetina monohexósido
6	15,1	350	543	381, 301	Quercetina sulfato monohexósido
7	17,3	364	543	381,301	Quercetina sulfato monohexósido
8	19,4	370	301	-	Quercetina
9	20,8	370	315	301	Isoramnetina

Estos estudios permiten confirmar que Q3G es incorporado y metabolizado por *C. elegans*. En su biotransformación el compuesto es desglicosilado, dando lugar a quercetina, que posteriormente sería glicosilada, sulfatada y/o metilada. Asimismo, el Q3G es quizás también sustrato en este mismo tipo de reacciones de conjugación, como podría sugerir la presencia de metabolitos diglicosilados o glicosilados y sulfatados. Similares reacciones de desconjugación de flavonol-glicósidos y de conjugación ocurren en el organismo mamífero, aunque con formación de glucurónidos en vez de glucósidos. Como se ha señalado, en mamíferos la desglicosilación es producida por β -glicosidasas intestinales como LPH y CBG (Day *et al.*, 1998; Murota y Terao, 2003). Los aglicones liberados son inmediatamente conjugados en el enterocito y posteriormente en el hígado a derivados metilados, glucurónidos y/o sulfatos (Ader *et al.*, 2000; Murota y Terao, 2003).

El gusano no posee hígado en su anatomía, pero sí se han descrito en el mismo actividades enzimáticas, β -glucosidasa, glucosiltransferasa y sulfotransferasa, siendo muchas de ellas enzimas citosólicas con homología con las existentes en humanos (Sherman *et al.*, 2005; Berninsone *et al.*, 2006). También se conoce que *C. elegans*

posee un sistema lisosomal altamente desarrollado, que contiene enzimas fosforilasas, glicosidasas y proteinasas (Bolanowski *et al.*, 1983; Sarkis *et al.*, 1988) que presentan muchas semejanzas con enzimas lisosomales humanas. Chateau *et al.* (2010) encontraron dos homólogos de los genes *klotho* en *C. elegans* que codifican las proteínas β -glucosidasas.

Al igual que en el caso de los gusanos tratados con quercetina y sus derivados metilados, se llevó a cabo la cuantificación de los metabolitos encontrados en los ensayos realizados a las distintas concentraciones de Q3G. La cuantificación se llevó a cabo por comparación de las áreas de los picos cromatográficos registrados a 370 nm con rectas de calibrado obtenidas con patrones externos de quercetina 3-O-glucósido, quercetina e isoramnetina.

Los resultados se expresaron como concentraciones relativas referidas a proteínas totales del gusano determinadas mediante el método de Bradford (μg de compuesto / mg de proteína). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla VI.2.

Tabla VI.2. Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) de quercetina 3-O-glucósido y de sus metabolitos determinados en *C. elegans* a las diferentes concentraciones ensayadas.

	Ensayo				
	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
Quercetina 3-O-glucósido	10,3 \pm 0,2*	14,1 \pm 3,0	21,7 \pm 5,0	73,1 \pm 8,7	157 \pm 16,3
Quercetina	5,8 \pm 2,2	8,3 \pm 1,7	24,9 \pm 4,1	89,7 \pm 7,9	173 \pm 23,4
Isoramnetina	nd	6,5 \pm 3,8	11,8 \pm 0,4	25,5 \pm 8,1	33,7 \pm 2,1
Suma de otros metabolitos [†]	28,4	63,4	73,7	174,6	274,6
Totales	44,5	92,3	132,1	362,9	638,3

* Todas las concentraciones están expresadas como μg de compuesto/mg proteína de gusano (media \pm desviación estándar; n=3). nd: no detectado; [†] expresada como equivalentes de quercetina.

Los resultados obtenidos parecían indicar que la capacidad de captación de Q3G por parte del nematodo era proporcional con la concentración del flavonol en el medio de cultivo. Para comprobarlo se estableció la correlación entre la

concentración de Q3G puesto en el medio y la concentración de metabolitos totales detectados en el gusano, pudiendo establecer que entre ambas existía un ajuste lineal con elevado coeficiente de correlación ($R^2 = 0,988$), lo que permitía confirmar que la capacidad de captación del compuesto por parte del gusano aumenta conforme aumenta la concentración del compuesto en el medio, en el intervalo de concentraciones ensayadas. Otro aspecto a destacar es que una parte importante del Q3G incorporado por el gusano es biotransformado (desglucosilado y adicionalmente conjugado), de modo que entre un 73 y 84 % del compuesto es recuperado en el gusano en forma de otros metabolitos.

La capacidad de incorporación de Q3G contrasta con el bajo nivel de captación de quercetina (ver apartado 5.2.5 del capítulo anterior), para la cual sólo 89,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína (tabla V.3) eran recuperados en forma de quercetina y metabolitos en el gusano trabajando con concentraciones de 200 μM del flavonol en el medio. En el caso de los derivados metilados, isoramnetina y tamarixetina, la recuperación era aún más baja (56,95 y 52,95 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, respectivamente).

La elevada hidrofobicidad de quercetina (y de sus derivados metilados) hace que la misma deba atravesar las membranas biológicas por difusión pasiva, mientras que el Q3G, hidrofílico, debería hacerlo por transporte facilitado. Desde hace tiempo se asume que los glucósidos de quercetina se absorben mal en el intestino delgado humano y que la ruta más probable del transporte intestinal es la difusión pasiva del aglicón tras la hidrólisis de los glucósidos por enzimas microbianas o del cepillo intestinal, como LPH y CBG (Day *et al.*, 1998; Murota y Terao, 2003). Day *et al.* (1998) demostraron que la enzima β -glucosidasa del intestino delgado y del hígado de humanos presenta distinta afinidad para hidrolizar los glicósidos de flavonoides dependiendo del tipo de azúcar y la posición de unión del mismo a la molécula de quercetina. Esta enzima presentaba alta afinidad cuando la glucosa estaba en posición 4' de la quercetina. Sin embargo, quercetina-3-O-glucósido era hidrolizado lentamente por esta enzima en el intestino delgado. En el caso de otros glicósidos, como quercetina-3-O-rutinósido y 3,4'-diglucósido, la enzima no era capaz de hidrolizar ni el enlace de la ramnosa a la quercetina existente en el rutinósido, ni el enlace glicosídico en 4'.

Como ya se ha señalado, en el organismo humano, la quercetina en su forma aglicón muestra una tasa de absorción relativa alta (10-50%) (Hollman *et al.*, 1996); sin embargo, la absorción directa de glicósidos de quercetina es en general baja, requiere transportadores de membrana que actúan de manera selectiva y quedaría limitada a algunos glicósidos particulares (Hollman *et al.*, 1999; Ader *et al.*, 2001; Wolfram *et al.*, 2002). Así, Hollman *et al.* (1995 y 1996) mostraron que en humanos los

glicósidos de quercetina también eran absorbidos en cierta medida 30 minutos después de la ingestión, y Gee *et al.* (2000) demostraron que quercetina 3-glucósido y quercetina-4'-glucósido, pero no quercetina 3,4'-diglucósido, eran transportados significativamente más rápido que quercetina aglicón. En ensayos realizados con ratas, Carbonaro y Grant (2005) observaron que era posible la absorción de quercetina 3-O-rutinósido en el intestino delgado, aunque con una velocidad de incorporación mucho más lenta que la de quercetina. Sin embargo, en humanos se encontró que quercetina 3-O-rutinósido se absorbía más lentamente que quercetina 4'-glucósido y que su biodisponibilidad era sólo un 15% de la que presentaba este último (Hollman, 1997; Graefe, 2001), lo que sugería que la absorción del rutinósido tenía lugar el intestino grueso. Por lo tanto, dependiendo de la posición y la naturaleza del azúcar podría o no producirse la absorción del compuesto en el intestino delgado.

Los resultados encontrados en *C. elegans* sugieren que en el mismo deben existir transportadores de membrana capaces de ser utilizados de manera eficaz por Q3G. En estudios *ex vivo* y con modelos animales se ha observado que transportadores de azúcares como SGLT-1 son capaces de transportar determinados glucósidos de quercetina, como Q3G, pero no quercetina 3-O-rutinósido o glucósidos de quercetina en otras posiciones (Day *et al.*, 1998; Day *et al.*, 2000 Ader *et al.*, 2001). Bianchi y Sampedro (2010) demostraron que al menos un transportador de glucosa sodio-dependiente, la proteína SGLT3, perteneciente a la misma familia que SGLT1, estaba presente en *C. elegans* y era capaz de actuar como un sensor *in vivo* de glucosa. Además, se sabe que el nematodo también posee nucleótidos transportadores multisustrato capaces de transportar azúcar (Caffaro *et al.*, 2006). Aunque el gusano sólo tiene siete azúcares diferentes en sus glicoconjugados, su genoma codifica 18 supuestos nucleótidos transportadores de azúcar, indicando la existencia de redundancia funcional entre estos transportadores, al igual que ocurre en humanos (Martinez-Duncker *et al.*, 2003). Uno de estos nucleótidos, el ZK896.9, que actúa como transportador para UDP-galactosa, UDP-N-acetilglucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina y UDP-glucosa en el aparato de Golgi, fue caracterizado en *C. elegans* por Caffaro *et al.* (2008).

A falta de establecer el proceso a través del cual es captado Q3G, el resultado global de nuestro estudio es que cuando se emplea este glucósido las concentraciones de quercetina y metabolitos relacionados que se encuentran en el gusano son muy superiores a las que aparecen en los ensayos realizados con quercetina o sus derivados metilados, lo que explicaría, como se discute en los apartados posteriores, los efectos más acusados que se producen en el nematodo en los distintos procesos estudiados. De este modo, se podría decir que el Q3G actuaría

facilitando el acceso de quercetina al interior del nematodo, donde se liberaría el aglicón que sería posiblemente el compuesto biológicamente más activo y responsable en gran medida de los efectos encontrados.

Para comprobar si la quercetina liberada por el gusano a partir de Q3G tenía su origen en la existencia de actividad β -glucosidasa por parte de *C. elegans*, se realizó un ensayo con mutantes inducidos que carecían de esta actividad. Para inducir la formación de mutantes se utilizaron 6 cepas de *E. coli* deficientes en la actividad β -glucosidasa (F13H10.1, F57B10.7, F52D1.1, F48E8.4, R03E9.2, R06A4.8), obtenidas del Caenorhabditis Genetics Center, que fueron empleadas con alimento de los gusanos. Las bacterias eran cultivadas en placas con medio NGM que contenían 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) como inductor para promover la inactivación del gen que codifica la β -glucosidasa. Sobre estas placas se incubaron gusanos en estado larvario L3-L4 durante 72 horas a 15 °C; de esta forma se generó una primera generación de gusanos que tenían inhibida la actividad β -glucosidasa. La progenie obtenida fue transferida a nuevas placas con las mismas condiciones anteriores, con el fin de asegurar que la segunda generación, con la que se iba a trabajar posteriormente, mantenía la mutación inducida. Estos gusanos, carentes de actividad β -glucosidasa, se cultivaron durante 4 a 6 días en medio NGM que contenía quercetina 3-O-glucósido (200 μ M) utilizando bacterias muertas como fuente de alimentación. Tras ese tiempo, los gusanos se recogieron y homogeneizaron en metanol y se analizaron por HPLC-DAD-MS como se describe en la sección de Materiales y Métodos (apartados 3.2.9).

En todos los ensayos con mutantes se encontró un perfil cromatográfico similar, donde se ponía de manifiesto la no formación de quercetina. La Figura VI.3 muestra como ejemplo el cromatograma obtenido para el mutante F48E8.4, donde se puede confirmar que no se detectaba la presencia de quercetina y sí de quercetina 3-O-glucósido (pico 2), lo que confirmaría que la existencia de actividad enzimática glucosidasa es necesaria para liberar quercetina en el gusano a partir de Q3G. Además, se detectó el pico 1, el cual mostraba un ion precursor $[M-H]^-$ de m/z 705, que producía tres fragmentos de m/z 543 (-162 amu, pérdida de un resto hexosa), m/z 463 (-162-80 amu pérdida de un resto hexosa y de otro sulfato), y m/z 301 (quercetina; pérdida dos restos hexosa y de uno sulfato), lo que permitía asociarlo a un quercetina sulfato-dihexósido. Este mismo metabolito ya había sido identificado en los ensayos llevados a cabo con el gusano tipo silvestre en presencia de quercetina 3-O-glucósido (pico 2 en la Figura VI.2). Esta identificación confirma lo ya sugerido más arriba respecto a que las actividades de conjugación (glicosidación y sulfatación) tendrían lugar no sólo sobre quercetina sino también utilizando Q3G como sustrato.

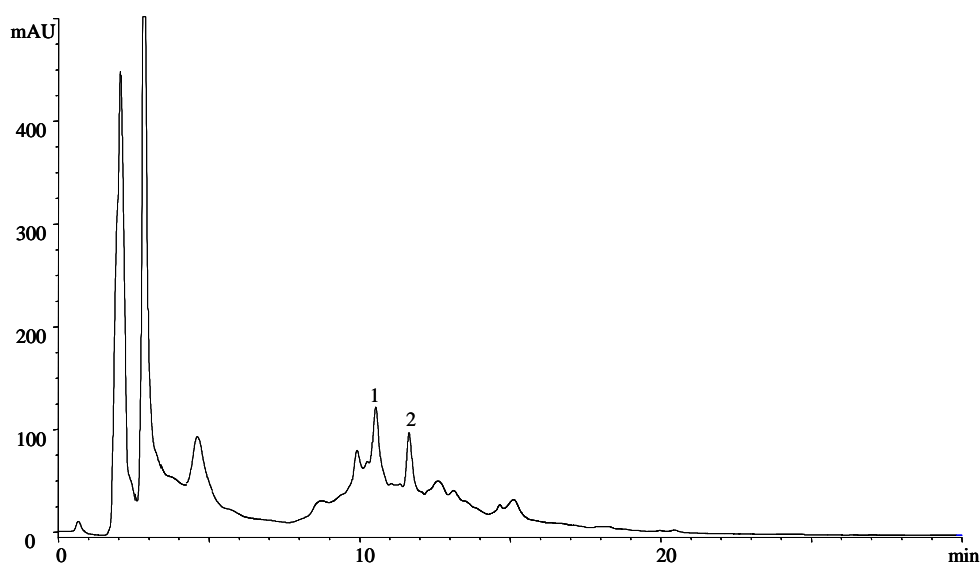


Figura VI.3. Cromatograma de HPLC registrado a 370 nm correspondiente al extracto obtenido de homogenizado del mutante F48E8.4 de *C. elegans* previamente cultivado en presencia de quercetina 3-O-glucósido 200 μ M.

6.2.2. ENSAYOS DE LONGEVIDAD

Los primeros estudios llevados a cabo con quercetina 3-O-glucósido se realizaron a una concentración de 200 μ M, con el fin de comparar sus efectos con los obtenidos con quercetina y sus derivados metilados descritos en el apartado 5.2.4 del capítulo anterior. Sin embargo, se encontró que a esta concentración de Q3G se producía una gran mortalidad de los gusanos con respecto al control (ver Figura VI.4), por lo que se pasó a trabajar con concentraciones más bajas.

La Figura VI.4 muestra las curvas de supervivencia de los gusanos cultivados en presencia de Q3G a diferentes concentraciones ensayadas comparadas con los gusanos control (sin tratamiento), así como la curva de supervivencia de quercetina 200 μ M. En la Tabla VI.1 se recogen los datos de vida media y máxima.

Todas las concentraciones de Q3G aumentaban la vida media de los gusanos adultos, excepto 200 μ M, que provocaba una disminución de un 17%, con respecto al control. La concentración de 25 μ M era la que originaba una mayor extensión en la vida media del nematodo, con un aumento de alrededor de un 23% con respecto al control.

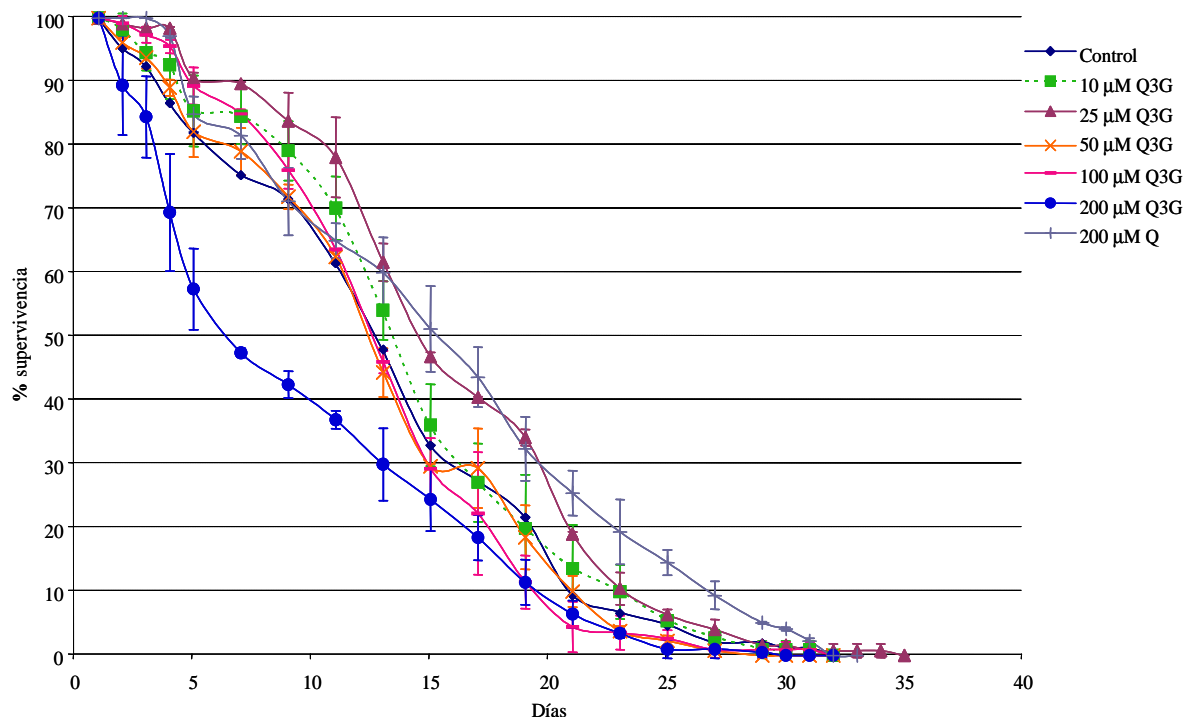


Figura VI.4. Curvas de supervivencia del *C. elegans* en presencia de diferentes concentraciones de quercetina 3-O-glucósido y de quercetina (200 µM).

También era la concentración de 25 µM la que producía una mayor extensión en la vida máxima del nematodo aproximadamente en 7%, calculado como la media del 10% de la población más longeva. A concentraciones de Q3G mayores de 25 µM se observaba una reducción en la vida máxima del animal, mayor a medida que aumenta la concentración de Q3G.

Como se recogía en el apartado 5.2.4, quercetina y sus derivados metilados a una concentración de 200 µM aumentaban la vida media del animal entre un 11 y 16%. Si relacionamos estos resultados de longevidad con los datos obtenidos sobre la capacidad de absorción y biotransformación que presenta el gusano tras la exposición a Q3G y quercetina (200 µM), se observa que la suma de la concentración de metabolitos cuantificables en el tratamiento de Q3G a la concentración de 25 µM es del mismo orden (92,3 µg/mg proteína; tabla VI.2) que el encontrado en los gusanos expuestos a quercetina a la concentración de 200 µM (89,6 µg/mg proteína; tabla V.3).

Tabla VI.3. Influencia de diferentes concentraciones de quercetina 3-O-glucósido sobre la duración de vida de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento a 20 °C.

Tratamiento	Promedio (días)	Mediana (días)	Máximo 10% (días)	<i>p</i> vs control (<i>log rank</i>)
Control	15,8 ± 0,5	14,0 ± 0,6	29,3 ± 0,6	
10 µM	17,7 ± 0,5	18,0 ± 0,4	29,9 ± 1,0	0,014
25 µM	19,4 ± 0,5	18,0 ± 0,7	31,3 ± 0,1	0,000
50 µM	16,6 ± 0,5	16,0 ± 0,4	27,7 ± 1,0	0,358
100 µM	16,6 ± 0,4	16,0 ± 0,4	26,8 ± 2,5	0,524
200 µM	13,1 ± 0,5	10,0 ± 0,9	26,4 ± 0,3	0,001

*Media ± desviación estándar (n=3), ^aMáximo 10% = Tiempo promedio de vida máximo del 10% de la población más longeva. El test *log-rank* indica las diferencias significativas en la vida media de un tratamiento con respecto al control (*p*<0,05).

Sin embargo, si se consideran exclusivamente las concentraciones de quercetina libre determinadas en el gusano tras exposición a 200 µM de quercetina (19,85 µg/mg proteína; tabla V.3) se observa que los niveles son superiores a los encontrados en el tratamiento con 25 µM de Q3G (8,3 µg/mg proteína; tabla VI.2) aunque los efectos observados son menores.

El cultivo en presencia de concentraciones de Q3G superiores a 25 µM conduce a niveles tanto de quercetina libre como de sus metabolitos en el gusano ya superiores a las producidas por el cultivo con 200 µM de quercetina en el medio, así como a una disminución en la longevidad. Son numerosos los estudios que señalan que los glicósidos, así como los metabolitos conjugados de flavonoides, son normalmente formas menos activas biológicamente que los aglicones (Williamson *et al.*, 1996), cabe suponer, por tanto, que los efectos encontrados puedan estar más relacionados con los niveles de quercetina libre existentes en el gusano, aunque tampoco se debe descartar que los metabolitos puedan también jugar algún papel en los efectos observados.

La existencia de una disminución en la actividad antioxidante y la capacidad captadora de radicales libres de flavonoides debida a glicosilación y conjugación es un hecho repetidamente observado en estudios *in vitro* (Wang *et al.*, 1997; Plumb *et*

al., 1998; Kuskoski *et al.*, 2004; Dueñas *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudios realizados en sistema *in vitro* (segmentos de arteria) e *in vivo* (ratas espontáneamente hipertensas) en los que ha participado nuestro grupo han permitido demostrar que metabolitos glicosilados de quercetina (quercetina-3,O-glucurónido) carecen por sí mismos de efectos sobre la función endotelial, sin embargo, muestran efectos antihipertensivos y vasorrelajantes tras ser desconjugados *in situ* liberando el aglicón, que es la forma realmente activa (Menendez *et al.*, 2011; Galindo *et al.*, 2011). En el estudio llevado a cabo con *C. elegans*, esta aparente falta de correlación entre las concentraciones de quercetina libre tisular y los efectos observados parece sugerir que por encima de un determinado nivel de quercetina (y/o metabolitos) en el nematodo comienzan a producirse efectos “indeseables” que reducen su viabilidad. La toxicidad observada para quercetina en estudios realizados por algunos autores en cultivos celulares se ha relacionado con su actividad pro-oxidante (Metodieva *et al.*, 1999; Boots *et al.*, 2008). Algunos autores han sugerido que bajas dosis de flavonoides podrían actuar como modulares de señalización dentro de la célula pudiendo causar un efecto de hormesis, traducándose en un aumento en la resistencia de estrés y en los mecanismos de reparación de daños (Gugler *et al.*, 1975; Chondrogianni *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2006). Igualmente, la existencia de un efecto pro-oxidante “suave” también podría tener un efecto “beneficioso” indirecto, al actuar como un reto a las defensas antioxidantes de un organismo y aumentar la expresión y actividad de los sistemas enzimáticos responsables de la metabolización de xenobióticos, dando como resultado global una citoprotección (Halliwell, 2008; Yang y Halliwell, 2010). Sin embargo, por encima de determinados niveles el balance oxidativo se desplazaría hacia la acumulación de ROS produciendo efectos tóxicos. Igualmente, en estudios con líneas celulares se ha observado que concentraciones de quercetina superiores a >100 μM podrían activar la ruta de las caspasas, dando lugar a apoptosis (Lee *et al.*, 2008, 2010; Shih *et al.*, 2004).

De este modo, el máximo efecto sobre la longevidad se situaría en torno a los niveles de quercetina detectados en el gusano en los ensayos con 25 μM de Q3G, por cuanto el efecto sobre la extensión en la vida del gusano es ya algo inferior en los ensayos con 200 μM de quercetina (23% frente a 11% de aumento en la vida media, respectivamente).

Según nuestros conocimientos, sólo hay un trabajo recientemente publicado por Xue *et al.* (2011), donde se estudie la longevidad de *C. elegans* en presencia de glucósidos de quercetina (20 $\mu\text{g/mL}$), en particular quercetina 3'-O-glucosa y quercetina 3-O-glucosa-(4 \rightarrow 1)-glucosa, observando que los gusanos tratados con los mismos extendían su vida media en un 12 y 20%, respectivamente; sin embargo, el

tratamiento con quercetina 3-O-rutinósido no mostraba ninguna influencia sobre la longevidad en el gusano. Aunque no es discutido por esos autores, esa observación podría ser coherente con la existencia de una captación activa de algunos glucósidos por parte del gusano, pero no del rutinósido, consistente con las observaciones de Ader *et al.* (2000) y Day *et al.* (2000) en otros modelos, como se ha comentado anteriormente. Los porcentajes de extensión en la duración de vida encontrados para los glucósidos por Xue *et al.* (2011) son del mismo orden a los observados en nuestro estudio a las concentraciones de Q3G más bajas ensayadas (10 μ M 12% y 25 μ M 23%). Las concentraciones usadas por estos autores es equivalente a 66 μ M lo nos indicaría que el compuesto ensayado por nosotros (Q3G) es más activo y posiblemente más biodisponible considerando que a una menor concentración produce efectos prácticamente similares.

6.2.3. ESTRÉS TÉRMICO

Los ensayos para establecer la influencia de las diferentes concentraciones de Q3G sobre la viabilidad del gusano frente al estrés térmico se llevaron a cabo en el primer día y sexto día de adulto, del modo en que se indica en el apartado 3.2.6.

La Figura VI.5 muestra el porcentaje de supervivencia de los gusanos tras ser sometidos a estrés térmico, después del pre-tratamiento con las diferentes concentraciones de Q3G. También se han incluido en la figura los valores observados para quercetina (200 μ M) con el fin de poder comparar los efectos. En el caso de los gusanos sometidos a estrés térmico en el primer día de adulto, se observó que la exposición previa al compuesto aumenta ligeramente la resistencia de *C. elegans* frente al aumento de temperatura, con un aumento en el número de gusanos vivos entre el 4 y el 12% con respecto al control, aunque no existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tratamientos. El mayor efecto protector frente a estrés térmico era encontrado a la concentración de Q3G 25 μ M, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control. Este efecto era además significativamente igual al producido por quercetina (200 μ M). Cuando el estrés térmico era inducido en el sexto día de adulto, el comportamiento era algo diferente, observando también un aumento en la tasa de supervivencia con las concentraciones de Q3G más bajas ensayadas (hasta 25 μ M en que se producía el máximo efecto). En este caso, la quercetina (200 μ M) era más eficaz en la protección del gusano frente al estrés térmico que Q3G a cualquiera de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, concentraciones de Q3G superiores a 50 μ M no se detecta ningún efecto protector por parte del glucósido, sino que al contrario, en el ensayo realizado con 100 μ M de Q3G se produce una caída importante en la tasa de supervivencia del gusano,

confirmando que estas concentraciones del compuesto tienen un efecto tóxico sobre el nematodo que se suma al ejercido por el estrés térmico. Esta observación es coherente con los efectos encontrados sobre la longevidad, ya que estas concentraciones de Q3G en el medio también conducían a una disminución en la duración de vida de *C. elegans*. Al igual que se discutió en ese caso, parece, por tanto, que la existencia en el gusano de quercetina y/o metabolitos por encima de determinados niveles ejerce un efecto tóxico sobre el gusano.

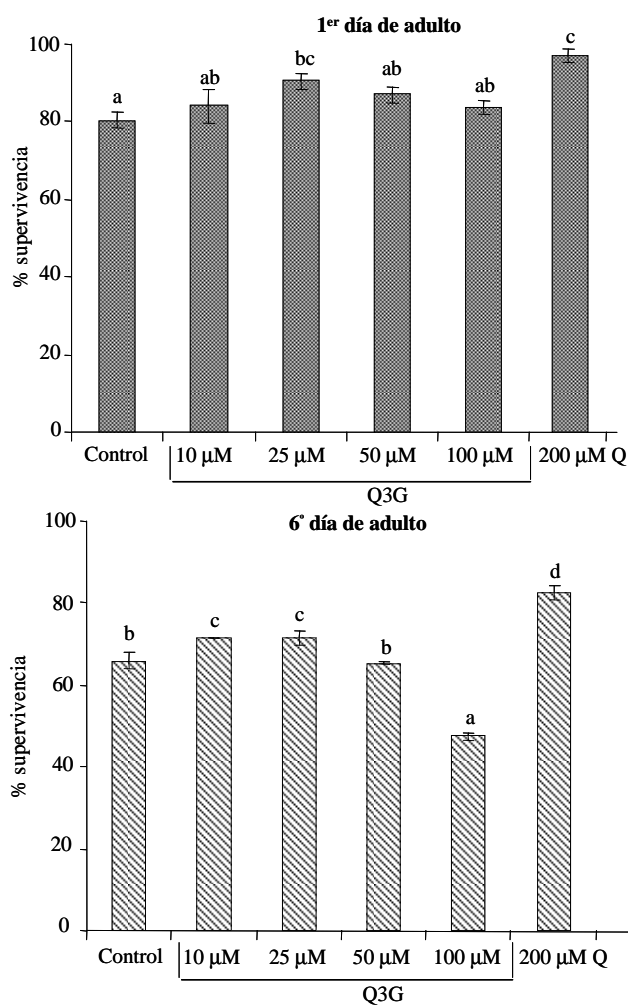


Figura VI.5. Porcentajes de gusanos supervivientes de *C. elegans* sanos sometidos a estrés térmico (35 °C, 8h) en el primer y sexto día de adulto tras pre-tratamiento con diferentes concentraciones de quercetina 3-O-glucósido y quercetina (200 μM). Los resultados corresponden en cada caso a la media de tres ensayos independientes.

Según nuestros conocimientos, el único estudio disponible en la bibliografía sobre el efecto de flavonol-glicósidos frente a estrés térmico en *C. elegans* fue realizado por

Kampkötter *et al.* (2007a), quienes estudiaron la influencia de quercetina 3-O-rutinósido. Estos autores encontraron que dicho compuesto a una concentración de 100 μM no ejercía ningún efecto protector frente al estrés térmico, comparado con la quercetina a la misma concentración, que sí lo tenía. Estos resultados se explicaban por el hecho de que la quercetina, pero no su glicósido, era capaz de afectar de manera significativa el factor de transcripción FoxO produciendo la translocación de la proteína DAF-16 del citoplasma al núcleo. Se ha descrito que este factor de transcripción está relacionado con algunas rutas de señalización que regulan la respuesta al estrés, como son la ruta de la insulina/IGF-1 y la de JNK-1 (Kenyon, 2005; Schaffitzel y Hertweck, 2006).

También se sabe que entre los objetivos de la proteína DAF-16 se encuentran los genes de distintas enzimas antioxidantes, como la superóxido manganeso dismutasa (*sod-3*) y catalasas (*ctl-1*, *ctl2*) (Murphy *et al.*, 2003). Hay que tener en cuenta, como ya se a señalado anteriormente en este capítulo, que la biodisponibilidad de quercetina 3-O-rutinósido podría ser muy baja, lo que también explicaría la ausencia de efectos encontrados por Kampkötter *et al.* (2007a), más allá de su incapacidad para influir sobre el factor de transcripción indicado.

6.2.4. ESTRÉS OXIDATIVO

Como se puede observar en la Figura VI.6, los gusanos pre-tratados con las diferentes concentraciones Q3G aumentaban significativamente sus tasas de supervivencia con respecto al control tras exposición al agente de estrés oxidativo (juglona) en los dos estados de desarrollo estudiados. En ambos casos, la mayor protección se observaba en los gusanos tratados con una concentración de 25 μM de Q3G. En los ensayos realizados donde el estrés oxidativo se inducía el primer día de adulto, la mejora en la supervivencia disminuía para concentraciones superiores del flavonol hasta dejar de ser significativa a la concentración de 200 μM con respecto a los controles. Sin embargo, cuando los gusanos eran sometidos a estrés en el sexto día de adulto, la tasa de supervivencia permanecía superior a la existente en el control para todas las concentraciones de Q3G ensayadas. Estos resultados vuelven nuevamente a sugerir que un mayor tiempo de cultivo en presencia del flavonol confiere al gusano mayor capacidad de resistencia frente a estrés oxidativo.

Comparando estos resultados con los recogidos en el apartado 5.2.4, se puede observar que el efecto protector frente a estrés oxidativo mostrado por Q3G a una concentración de 25 μM es similar (ensayos en primer día de adulto) o ligeramente inferior (sexto día de adulto) al inducido por 200 μM de quercetina. Al contrario de los

encontrados en los ensayos anteriores de longevidad y resistencia a estrés térmico, en este caso no se observa ningún efecto "tóxico" aparente a ninguna de las concentraciones de Q3G ensayadas, sino que el tratamiento con este compuesto redunda siempre en una mayor protección de los gusanos frente al estrés oxidativo. Por otra parte, aunque en los ensayos de estrés inducido en el primer día de adulto se apunta una cierta relación inversa entre las concentraciones ensayadas y el efecto observado (aumento a bajas concentraciones de Q3G y disminución a las más altas), esta relación no se detecta en los ensayos en sexto día de adulto, entre los cuales no hay un efecto significativamente diferente (si se exceptúa el ensayo con 50 μ M de Q3G). Realmente no disponemos de explicación para estas observaciones, no consistentes con las realizadas en el resto de estudios con Q3G, y en cuyos mecanismos será, por tanto, necesario profundizar.

Kampkötter *et al.* (2007a) estudiaron la influencia de la quercetina y quercetina 3-O-rutinósido sobre la acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo. Los resultados obtenidos por esos autores demostraron que aunque ambos flavonoles atenuaban la acumulación de ROS, era la quercetina la que únicamente proporcionaba un aumento en la protección frente al estrés térmico y oxidativo. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por esos autores, ya que Q3G se muestra más eficaz que quercetina en sus efectos protectores frente a estrés oxidativo. Al igual que se comentó para resistencia a estrés térmico, ello podría ser debido a la baja (o nula) disponibilidad de quercetina 3-O-rutinósido (vista en modelos mamíferos) contrariamente a la de Q3G. En otros trabajos se ha sugerido que los efectos protectores que presentan los flavonoles tanto frente a estrés oxidativo como térmico en *C. elegans*, no sólo se relacionan por su capacidad antioxidante *in vitro*, sino también por su implicación en otros mecanismos, como la inhibición de enzimas generadores de ROS junto con una variación en la síntesis de proteínas del "shock" térmico (HSPs), las cuales son altamente inducibles durante el estrés oxidativo y térmico (Lithgow *et al.*, 1995; Link *et al.*, 2003; Kampkötter *et al.*, 2007a, Van Raamsdonk 2010).

Algunos autores han sugerido que dosis bajas de flavonoides (< 50 μ M para líneas celulares) actuarían como modulares de señalización dentro de la célula, pudiendo causar un efecto de hormesis, traducándose en un aumento en la resistencia al estrés y en los mecanismos de reparación, y algunas veces en un aumento en la longevidad en diversas especies y líneas celulares en respuesta a estresantes suaves (Gugler *et al.*, 1975; Chen *et al.*, 2006; Chondrogianni *et al.*, 2010). Sin embargo, concentraciones superiores (>100 μ M) podrían activar la ruta caspasa, dando lugar a apoptosis (Shih *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008, 2010).

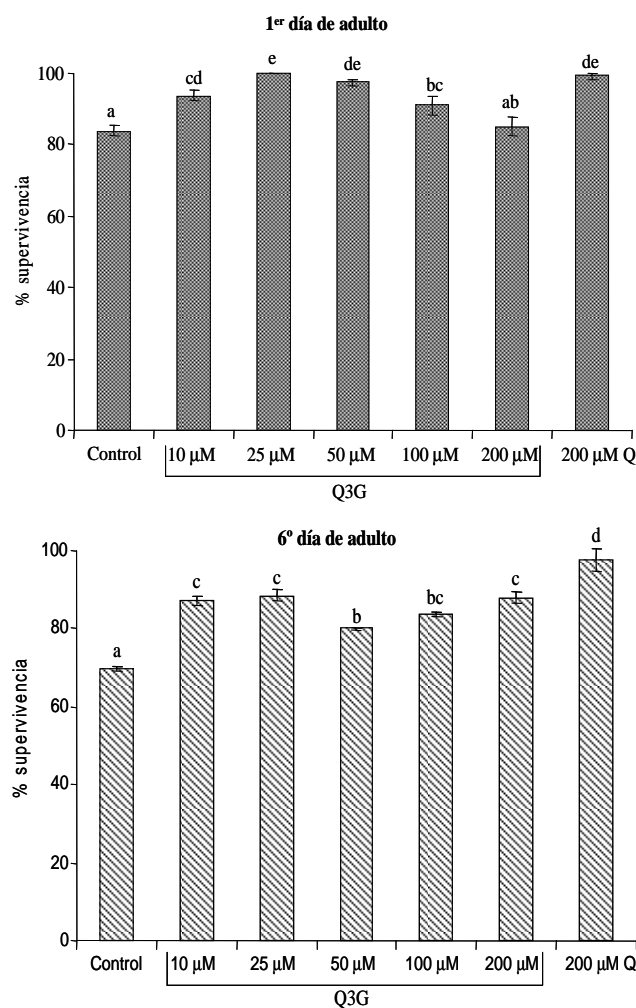


Figura VI.6. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sanos sometidos a estrés oxidativo inducido por juglona (150 µM, 24 h, 20 °C) en el primer y sexto día de adulto tras pre-tratamiento con diferentes concentraciones de quercetina 3-O-glucósido y quercetina (200 µM). Los resultados corresponden en cada caso a la media de tres ensayos independientes.

Los estudios aquí realizados no permiten discutir con base sobre los mecanismos moleculares implicados en los efectos observados, por lo que serán necesarios estudios posteriores (p.ej., estudios de expresión génica o de actividades enzimáticas) para llegar a conclusiones de mayor alcance al respecto.

6.2.5. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

a) Longitud del cuerpo

La Figura VI.7 muestra la influencia de diferentes concentraciones de Q3G (10-200 μM) y quercetina 200 μM en el medio de cultivo sobre el tamaño del gusano. Se observó una disminución progresiva en la longitud de cuerpo del nematodo conforme aumentaba la concentración de Q3G. A las concentraciones más bajas ensayadas (10 y 25 μM) la disminución de tamaño era del 3-5%, aunque no existían diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los gusanos sin tratar. A partir de una concentración de 50 μM la disminución en el tamaño del gusano (12%) era ya significativa, llegando a ser del 20% a la concentración máxima ensayada (200 μM). Este efecto era muy diferente del alcanzado con quercetina a 200 μM , donde se apreciaba un aumento (11%) en la longitud del cuerpo con respecto al control, tal y como se recoge en el capítulo anterior (apartado 5.2.1).

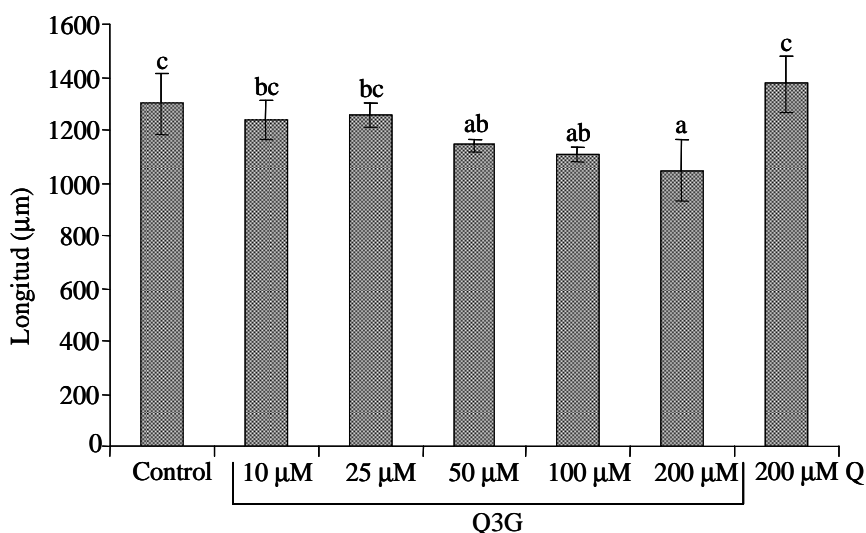


Figura VI.7. Efecto de la concentración de quercetina 3-O-glucósido y quercetina (200 μM) sobre la longitud del cuerpo de *C. elegans*.

La disminución en el tamaño del gusano más pronunciada a las concentraciones de Q3G más elevadas ensayadas podría quizás representar un efecto "indeseable" de la presencia en el nematodo de concentraciones de quercetina (y/o metabolitos) progresivamente más altas con el aumento en la concentración Q3G en el medio, al igual que se observaba en los ensayos de longevidad.

b) Reproducción

La exposición de *C. elegans* a diferentes concentraciones de Q3G tenía un efecto sobre la reproducción similar al observado en el caso anterior (Figura VI.8). La capacidad reproductiva del gusano se veía afectada negativamente, siendo la influencia mayor a medida que aumentaba la concentración de compuesto. A la concentración más baja ensayada (10 μ M) existía ya una disminución significativa ($p < 0,05$) en la progenie con relación a los controles (descenso de un 31%), el efecto era aún mayor para las concentraciones entre 25 y 100 μ M, con disminuciones entre 44% y 53%, si bien sin que se observaran diferencias significativas entre ellas, mientras que el tratamiento con 200 μ M producía una disminución más acusada (76%) en la capacidad reproductiva del gusano, significativamente mayor que en los casos anteriores.

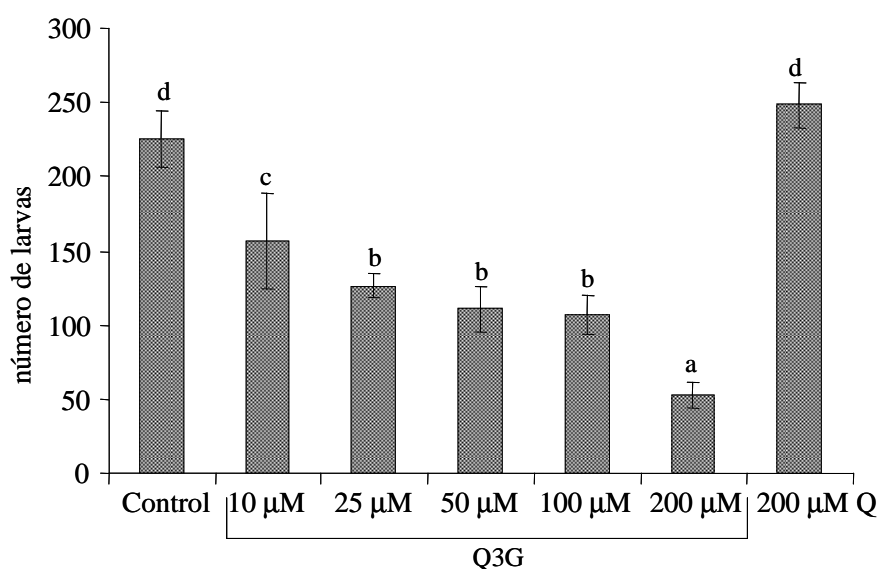


Figura VI.8. Efecto de la concentración de quercetina 3-O-glucósido y quercetina (200 μ M) sobre la capacidad reproductiva de *C. elegans*.

Este efecto era muy diferente del alcanzado con quercetina a 200 μ M, donde se apreciaba un aumento (7%) en la fertilidad del gusano con respecto al control, tal y como se recoge en la Figura (VI.8).

La reducción encontrada para el tamaño del gusano y la reproducción del gusano en los tratamientos con Q3G no parece, por tanto, estar relacionada con la

mayor biodisponibilidad que presenta Q3G frente a quercetina, ya que el efecto "indeseable" se observa ya desde la concentración de Q3G más baja ensayada (10 μ M). Esto podría indicar que Q3G por sí mismo (o alguno de los metabolitos formados) afecta a rutas de señalización que modulan la expresión de genes implicados en los procesos de crecimiento y/o reproducción del nematodo.

Los estudios realizados no permiten concluir sobre los posibles mecanismos implicados en la disminución del tamaño y la capacidad reproductiva en los gusanos tratados con Q3G. Será, por tanto, necesario realizar más estudios para obtener algún tipo de información que permita discutir acerca de los mismos.

6.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Los estudios realizados han permitido establecer que los gusanos son capaces de captar quercetina 3-O-glucósido de manera más eficaz que quercetina, así como biotransformarlo por desglicosilación y conjugación hacia diferentes metabolitos glicosilados, sulfatados y metilados. Entre un 73 y 84 % de Q3G es recuperado en el gusano en forma de metabolitos.

La existencia de capacidad desglicosilante por parte de *C. elegans* fue confirmada mediante ensayos con mutantes inducidos carentes de actividad β -glucosidasa, pudiendo establecer que ésta era necesaria para la transformación de Q3G y la posterior formación de metabolitos. La cuantificación de Q3G y sus principales metabolitos indica que la capacidad de captación de este glicósido por parte del nematodo es proporcional a la concentración del mismo en el medio de cultivo.

Otra conclusión que se deriva de las observaciones realizadas es que la existencia de quercetina en el gusano por encima de determinados niveles produce efectos aparentemente tóxicos. Así, niveles de quercetina como los que se encuentran en *C. elegans* en los ensayos realizados con Q3G hasta una concentración 25 μ M o en los llevados a cabo con quercetina a 200 μ M redundan en efectos que podríamos considerar "beneficiosos" sobre la longevidad y resistencia al estrés térmico del nematodo. Sin embargo, la presencia en el nematodo de concentraciones superiores de quercetina, como las que ya aparecen en los ensayos realizados con >50 μ M de quercetina 3-O-glucósido (alrededor de 25 μ g de quercetina/mg proteína de gusano) llevaría ya a la aparición de algunos efectos tóxicos, conduciendo a una menor duración de vida.

El conjunto de resultados obtenidos sugiere que quercetina 3-O-glucósido actuaría como una especie de “transportador” de quercetina hacia el interior del nematodo, donde se liberaría luego quercetina, que sería posiblemente el compuesto biológicamente activo y responsable en gran medida de los efectos encontrados. Se debe matizar, en todo caso, que la quercetina no tendría porqué ser la única responsable de esos efectos, aunque sí es posiblemente la forma más activa, ya que cabría esperar que los metabolitos conjugados fueran menos activos, como se deriva de estudios en otros modelos (Piskula, 1999; Crespy, 2002). A la luz de las observaciones realizadas parece ahora necesario realizar estudios con gusanos mutantes que carezcan de actividad β -glucosidasa para comprobar la existencia de menores efectos, o eventual ausencia de los mismos, cuando de Q3G no es desglicosilado.

VII. ESTUDIO SOBRE LOS EFECTOS DE (EPI)CATEQUINA Y LOS DERIVADOS *O*-METILADOS DE EPICATEQUINA SOBRE ESTRÉS OXIDATIVO, TERMOTOLERANCIA, LONGEVIDAD Y BIODISPONIBILIDAD EN *Caenorhabditis elegans*.

7.1. INTRODUCCIÓN

Los flavan-3-oles (catequinas y proantocianidinas) son uno de los principales grupos de flavonoides, presentes en muchos alimentos de origen vegetal tales como té, vino, manzanas, chocolate y uvas. En sus medios naturales los flavan-3-ol pueden encontrarse como monómeros (catequinas) o formando las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas (Figura II.7 y II.8 capítulo II). Las unidades de flavan-3-ol, a su vez, pueden encontrarse esterificadas en el hidroxilo de la posición 3, generalmente con ácido gálico, como por ejemplo (-)-epigallocatequina-3-*O*-galato (EGCG), polifenol mayoritario en té verde. Estos compuestos se encuentran raramente en forma glicosilada, contrariamente a los otros grupos de flavonoides.

Los flavan-3-ol se han relacionado con numerosas actividades biológicas generalmente establecidas *in vitro*; entre otras, se ha descrito que presentan potentes propiedades antioxidantes, inhiben la peroxidación de lípidos (Waterhouse *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 2001), inhiben el crecimiento de líneas celulares cancerígenas humanas (Kashiwada *et al.*, 1992), poseen efectos inmunorregulatorios, suprimen los peroxinitritos que inducen la nitración de la tirosina *in vitro* (Arteel *et al.*, 1999), y protegen a los fibroblastos y a las neuronas de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Spencer *et al.*, 2001). En ensayos *in vivo*, se ha demostrado que el consumo de catequinas y proantocianidinas mejora el estado antioxidante, atenuando el desarrollo de la arteriosclerosis, disminuye el daño de DNA y retrasa el desarrollo tumoral (Bomser *et al.*, 1999; Simonetti, *et al.*, 2002).

Hay algunos trabajos centrados en conocer la acción que ejercen algunos flavanoles sobre *C. elegans* en lo que se refiere a longevidad y a resistencia al estrés oxidativo (Brown *et al.*, 2006; Abba y Win, 2009; Saul *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009, 2010; Sunagawa *et al.*, 2011). El único trabajo publicado sobre catequina demuestra que prolonga la vida media del nematodo y aumenta la resistencia al estrés oxidativo y térmico (Saul *et al.*, 2009). También se ha mostrado que uno de los principales componentes del té verde, EGCG, induce una reducción significativa en los niveles intracelulares de H₂O₂ y lipofuscina en *C. elegans*, traduciéndose en una mejora en la resistencia al estrés oxidativo (Brown *et al.*, 2006; Abba y Win, 2009). Sin embargo, existen discrepancias en lo referente al efecto que ejerce este compuesto sobre la longevidad del nematodo. Mientras que Brown *et al.* (2006) y Zhang *et al.* (2009) no encontraron ningún efecto de EGCG sobre la longevidad de *C. elegans* en condiciones normales, en gusanos sometidos a estrés, este flavanol mejoraba considerablemente la vida media del nematodo. Zhang *et al.* (2009) sugirieron la existencia de una relación entre las proteínas asociadas con el envejecimiento con los

efectos de extensión de la longevidad. Abbas y Wink (2009) realizaron un estudio a distintas concentraciones de EGCG, observando un aumento en la longevidad de la cepa silvestre del gusano para un intervalo óptimo de concentración entre 200 y 400 μ M. Recientemente, Sunagawa *et al.* (2011) mostraba que gusanos expuestos a un extracto de procianidinas obtenido de manzanas, compuesto principalmente por dímeros y trímeros, aumentaban la vida media, pero no veían afectados sus tasas de crecimiento y fecundidad; sin embargo, la exposición a epicatequina no ejercía ningún efecto sobre la vida media del gusano.

En lo que nosotros conocemos, no existen datos sobre captación y metabolismo de flavanoles por *C. elegans*. Sin embargo, en el organismo humano, tras la ingestión de catequinas, pueden ser parcialmente absorbidas en el intestino delgado para ser biotransformadas a metabolitos sulfatados, glucurónidos y/o metilados (Donovan *et al.*, 1999; Baba *et al.*, 2002). Los principales metabolitos de catequinas identificados en plasma humano son derivados metilados; en el caso de catequina, el compuesto predominante parece ser 3'-*O*-metilcatequina (Donovan *et al.*, 1999), aunque también se han encontrado metabolitos mono y di-metilados en otras posiciones, así como glucurónidos principalmente en las posiciones 5 ó 7. Los principales metabolitos descritos de epicatequina son 4'-*O*-metil-epicatequina, epicatequina-3'-glucurónido, 4'-*O*-metil-epicatequina-3'-*O*-glucurónido y 4'-*O*-metil-epicatequina-5 (7)-*O*-glucurónido (Natsume *et al.*, 2003).

Las proantocianidinas y catequinas no absorbidas en el intestino delgado pueden ser degradados por la microflora del colon dando lugar a metabolitos de bajo peso molecular, que podrían ser posteriormente absorbidos (Déprez *et al.*, 2000), entre ellos diversos ácidos fenólicos, como los ácidos fenilacético, fenilpropiónico, fenilvalérico y benzoico, y tri-, di- y monohidroxifenilvalerolactonas (Das, 1971; Li *et al.*, 2000). Los efectos antioxidantes y biológicos de una dieta rica en flavanoles se podrían explicar no sólo por la absorción de los monómeros de catequinas, sino también por la de estos metabolitos de bajo peso molecular con agrupamientos di- y trihidroxifenilo (Rios *et al.*, 2003; Manach *et al.*, 2005).

Las propiedades biológicas que presentan *in vitro* los metabolitos conjugados pueden ser diferentes a las de las catequinas originales. Por ejemplo, se ha demostrado que la metilación disminuye la actividad antioxidante *in vitro* con respecto a (epi)catequina (Dueñas *et al.*, 2010). A pesar de ello, se ha observado en ensayos *in vivo* que 3'-*O*-metilepicatequina muestra un fuerte efecto protector frente al estrés oxidativo en neuronas y fibroblastos (Schroeter *et al.*, 2000; Spencer *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que no hay ningún estudio sobre la influencia de derivados metilados de epicatequina, formas principales en el metabolismo de catequinas en humanos, en este capítulo nos planteamos como objetivo estudiar el efecto de catequina, epicatequina y metabolitos metilados de epicatequina (Figura VII.1) sobre las características fenotípicas, resistencia al estrés oxidativo y térmico, y longevidad de *C. elegans*, así como su biodisponibilidad.

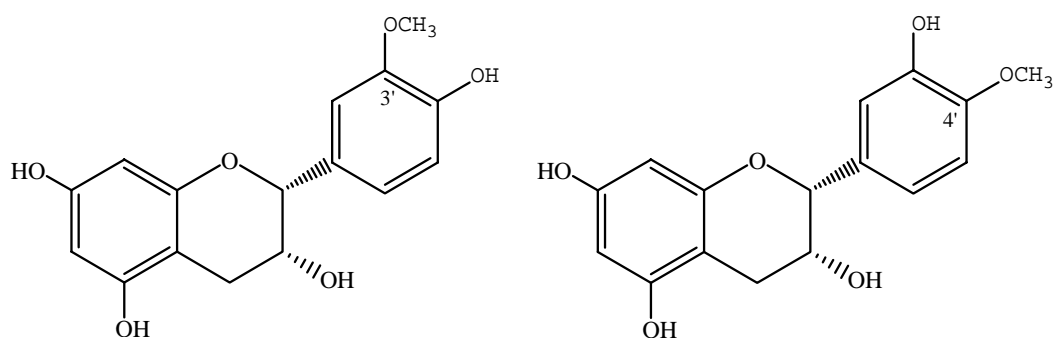


Figura VII.1. Estructuras de 3'-*O*-metilepicatequina y 4'-*O*-metilepicatequina.

7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

a) Longitud del cuerpo

La Figura VII.2 muestra la influencia de los flavanoles ensayados sobre la longitud del gusano, determinada al sexto día de adulto, cuando los gusanos culminaban su periodo reproductivo. Se observó que el tratamiento con epicatequina y 4'-*O*-metilepicatequina (200 μ M) producía un ligero incremento de aproximadamente el 3,5% en la longitud de cuerpo, mientras que el tratamiento con 3'-*O*-metilepicatequina producía una ligera disminución en el tamaño del gusano de aproximadamente un 3,5%, aunque estas variaciones no eran significativamente diferentes con respecto a lo observado en el control ($p < 0,05$).

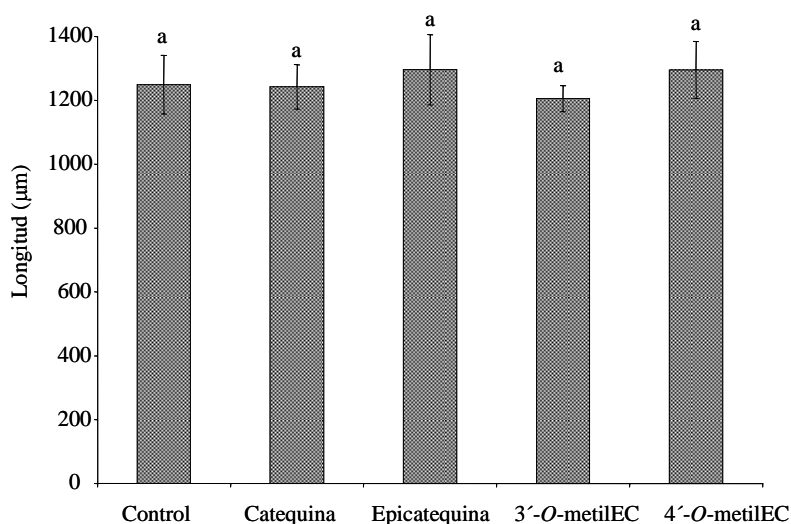


Figura VII.2. Efecto de tratamiento de los flavanoles ensayados sobre la longitud del cuerpo de *C. elegans*.

Estos resultados estaban de acuerdo con los obtenidos por Sunagawa *et al.* (2011), quienes tampoco encontraron diferencias significativas en el tamaño de los nematodos tratados con un extracto de procianidinas, compuesto principalmente por dímeros y trímeros, obtenido de manzanas, a una concentración de 65 µg/mL en el medio de cultivo. Sin embargo, nuestros resultados están en discrepancia con los resultados obtenidos por Saul *et al.* (2009), los cuales observaban una disminución significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 6% en el tamaño del cuerpo de los gusanos tratados con catequina 200 µM frente al control. La diferencia con nuestros resultados podría ser debida a que esos autores llevaron a cabo sus ensayos con nematodos de generación F1, cuyos padres ya habían sido tratados con catequina, mientras que en nuestro estudio se ha determinado en los gusanos padre.

Como ya se discutió en el apartado 5.2.1a del capítulo V, sobre los efectos de quercetina y sus derivados metilados sobre la longitud, algunos autores relacionaron la disminución en el tamaño del gusano por mecanismos similares a los inducidos por la restricción calórica (Lakowski, 1998; Mörck y Pilon, 2006; Kampkötter *et al.*, 2007c.). Sin embargo, Saul *et al.* (2009), explicaron la reducción en el tamaño del nematodo mediante la teoría del "soma disponible" (Kirkwood, 1987). De acuerdo con la misma, la cantidad de energía disponible en un organismo es distribuida en tres sectores, mantenimiento, crecimiento y reproducción. El consumo de energía adicional que es necesario para facilitar un aumento en la longevidad (como el que puede producirse en los gusanos tratados con catequinas), causaría por lo tanto un desequilibrio en la

energía resultante, dando lugar por ejemplo a efectos negativos en el crecimiento del gusano o en la reproducción.

b) Reproducción

El tratamiento de las catequinas y los derivados metilados de epicatequina tenían un efecto positivo sobre el desarrollo reproductivo del gusano (Figura VII.3). Se puede observar que los gusanos tratados con los distintos flavanoles (200 μ M) aumentaban la producción de huevos entre un 5 y 13%, con respecto al control, siendo los tratamientos con catequina y 4'-*O*-metilepicatequina los que mostraban un efecto mayor. Sin embargo, los aumentos observados no eran en ningún caso significativos ($p < 0,05$) con relación a los controles en ninguno de los tratamientos ensayados.

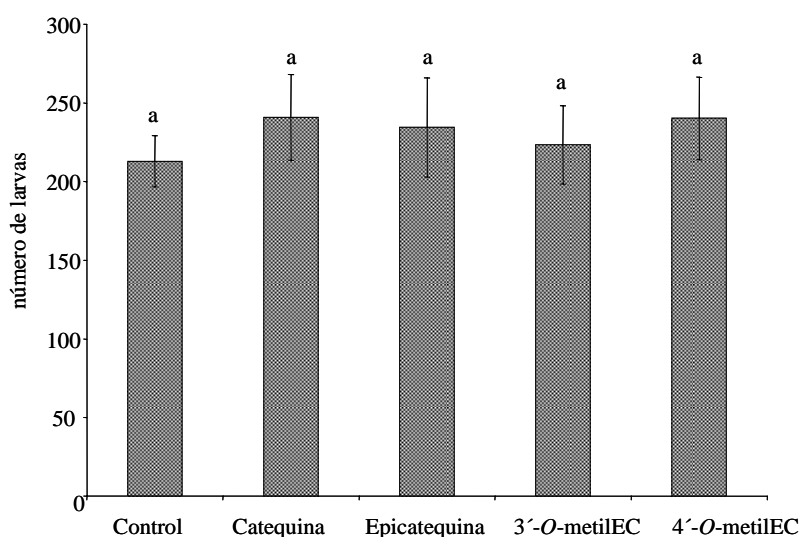


Figura VII.3. Efecto de los tratamientos con flavanoles sobre la reproducción en *C. elegans*.

Estos resultados eran coherentes con los efectos encontrados por Sunagawa *et al.* (2011), quienes observaron que el desarrollo reproductivo no se veía afectado significativamente con un extracto de procianidinas (65 μ g/mL) compuesto principalmente por dímeros y trímeros. Saul *et al.* (2009) también llegaron a la conclusión de que la reproducción del nematodo no estaba modulada significativamente por la exposición a catequina (200 μ M), aunque podría detectarse

una reducción en la tasa reproductiva en condiciones más estrictas que las probadas en su estudio. Estos autores también sugerían que aunque no observaban efecto en la reproducción tras el tratamiento con catequina, el mismo no debería excluirse ya que podría estar unido a la reducción del crecimiento de los gusanos, por la teoría de "soma disponible", sugiriendo que la catequina podría en otras circunstancias causar una redistribución de energía de la sección crecimiento del gusano al mantenimiento del gusano.

7.2.2. ESTRÉS TÉRMICO

La influencia del estrés térmico sobre la viabilidad del gusano, se llevó a cabo en dos estados de desarrollo: primer día y sexto día de adulto, tal y como se recoge en el apartado 3.2.6 del capítulo de Materiales y Métodos.

La Figura VII.4 muestra el porcentaje de supervivencia de los gusanos tras ser sometidos a estrés térmico, después de haber sido tratados con los diferentes flavanoles ensayados. En todos los casos, la exposición previa a los flavonoles aumentaba significativamente la termorresistencia de *C. elegans* con respecto a los animales sin tratar. En el primer estado de desarrollo, era el tratamiento con epicatequina el que ejercía un mayor efecto protector, aumentando la tasa de supervivencia un 19%, significativamente ($p < 0,05$) con respecto al control. La resistencia de *C. elegans* frente a la temperatura aumentaba también en los gusanos previamente tratados con catequina y con los metilados de epicatequina entre un 5 y un 10%, no encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre esos tratamientos.

Cuando el ensayo se realizaba con gusanos en el 6º día de adultos, el efecto protector de los flavanoles frente al estrés térmico era superior que en el 1º día de adultos, tal y como se puede observar en la Figura VII.4. La mayor tasa de supervivencia en el segundo estado de desarrollo se encontró en los gusanos tratados con los derivados metilados de epicatequina, aumentando la tasa de supervivencia alrededor de un 39%, con respecto al control, aunque no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos metilados ensayados. Los gusanos expuestos a catequina y epicatequina también acusan mayor protección frente al aumento de temperatura que los gusanos sin tratar (aumento en la tasa de supervivencia de 27% y 33%, respectivamente). En un estudio anterior, Saul *et al.* (2009), también encontraron que el pre-tratamiento con catequina (200 μ M) mejoraba la tolerancia térmica de los nematodos sometidos a estrés térmico (35 °C, 8 h) en el 6º día de adulto, si bien observando gran variabilidad en la tasa de supervivencia en cinco ensayos independientes, oscilando entre un 4 y 15%, aunque la mejora observada era inferior a

la encontrada en nuestro estudio. Zhang *et al.* (2009), estudiaron el efecto del tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones sobre la resistencia al estrés térmico de *C. elegans*, encontrando un aumento en la supervivencia del 13% a 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 8% a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ y 11% a 10 $\mu\text{g/mL}$. No obstante, las condiciones empleadas en ese trabajo eran diferentes a las usadas en nuestros ensayos, ya que los gusanos en el segundo día de adulto eran pre-tratados durante 48 horas con el compuesto de interés y luego sometidos a 30 °C durante media hora y 35 °C durante una hora.

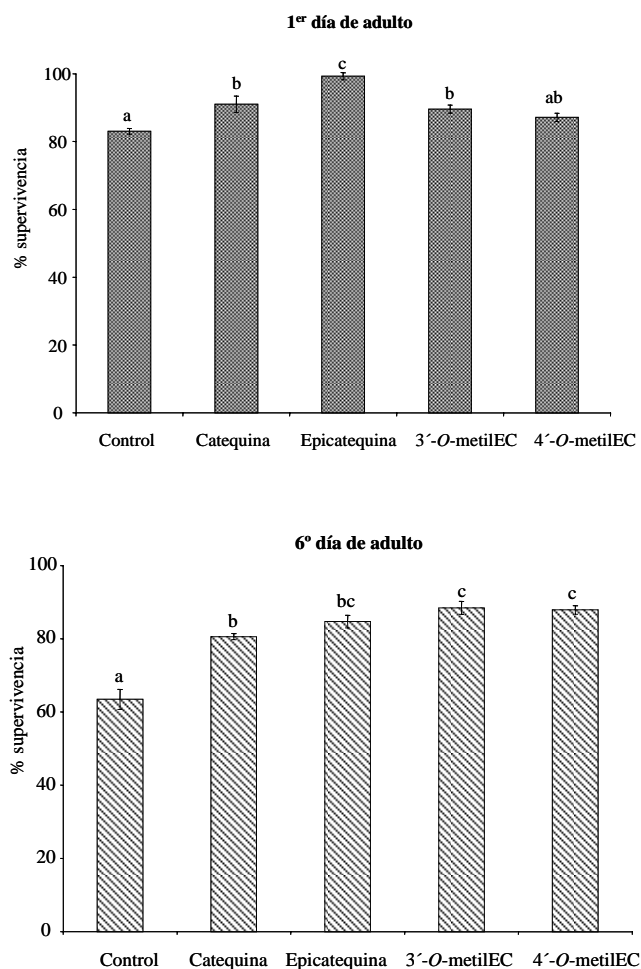


Figura VII.4. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sanos sometidos a estrés térmico (35 °C, 8h) en el primer y sexto día de adulto tras pre-tratamiento con catequina, epicatequina, 3'-O-metilepicatequina y 4'-O-metilepicatequina (200 μM). Los resultados corresponden en cada caso a la media de tres ensayos independientes.

La generación de especies reactivas de oxígeno se ha señalado como una de las principales causas de toxicidad en el estrés térmico (Kampkötter *et al.*, 2007c). Saul

et al. (2009) sugirieron que el aumento en la tolerancia al estrés térmico producido por catequina podría ser debido a un proceso de captación de ROS. Esta hipótesis estaba apoyada por los resultados de Huang *et al.* (2006), quienes mostraron que la exposición a catequina daba lugar a una mejora en la actividad de enzimas antioxidantes y a un aumento en la expresión en las proteínas de reparación de las células microgliales. Como ya se comentó en el capítulo 5.2.2, la resistencia al estrés térmico está en gran parte determinada por la síntesis de las proteínas de “shock” térmico (HSP), cuyos genes son, en muchos casos y de forma coordinada, expresados junto con los genes que regulan la respuesta al estrés oxidativo (Parsell y Lindquist, 1994). Se ha observado que estos genes se activan en respuesta al estrés oxidativo y térmico (Link *et al.*, 2003). Las HSP son un grupo de polipéptidos de bajo peso molecular que se encuentran en la mayoría de los organismos (de Jong *et al.*, 1998), cuya producción está bajo el control de la ruta de señalización de *daf-2*/insulina, la cual es considerada determinante en la resistencia al estrés y en la longevidad en *C. elegans* (Ogg *et al.*, 1997). Zhang *et al.* (2009), demostraron que el tratamiento con EGCG podía activar la expresión del gen de las proteínas de “shock” térmico HSP-16.2 en *C. elegans* transgénicos CL2070, en condiciones de estrés térmico. Similares resultados fueron obtenidos por Abbas y Wink, (2010) con gusanos silvestres N2 tratados también con EGCG pero sometidos a estrés oxidativo, encontrando que esta catequina también regulaba la expresión de las proteínas HSP-16.1 y HSP-16.2.

7.2.3. ESTRÉS OXIDATIVO

Como se puede observar en la Figura VII.5, el tratamiento con los distintos flavanoles aumentaba significativamente la tasa de supervivencia de los gusanos con respecto al control cuando el estrés se aplicaba en el primer día de adulto. El compuesto que producía mayor protección era epicatequina, que aumentaba significativamente la tasa de supervivencia alrededor de un 23%. El tratamiento con los dos derivados metilados de epicatequina también mejoraba la resistencia al estrés oxidativo, con un aumento en la tasa de supervivencia en torno al 22%, sin que se observaran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres compuestos, aunque sí con relación a catequina, la cual aumentaba la tasa de supervivencia en un porcentaje inferior (13%).

El tratamiento con los distintos flavanoles también mejoraba significativamente la respuesta al estrés oxidativo con respecto a los animales sin tratamiento cuando el estrés era inducido en el sexto día de adulto, e incluso de manera más acusada que en el primer día de adulto. En este caso, los animales tratados con catequina,

epicatequina y 4'-*O*-metilepicatequina fueron los que ejercieron un mayor efecto de protección, aumentando significativamente en un 68%, 76% y 71%, respectivamente. En ambos estados de desarrollo, la epicatequina se mostró como el compuesto más eficaz. En estudios previos de nuestro grupo (Dueñas *et al.*, 2010) se encontró que catequina, epicatequina y sus derivados metilados se comportaban como mejores antioxidantes y captadores de radicales libres en sistemas *in vitro* que reconocidos antioxidantes como α -tocoferol, siendo epicatequina la que presentaba la mayor capacidad antioxidante, lo que está de acuerdo con los resultados ahora encontrados en *C. elegans*, por lo que no se puede descartar que los efectos protectores encontrados puedan estar relacionados, al menos en parte, con una acción antioxidante y/o captación de radicales libres directa de los compuestos ensayados.

La pronunciada actividad antioxidante que presentan los flavanoles para captar los radicales DPPH*, ABTS* y anión superóxido, y para atenuar los niveles de H₂O₂ intracelular (Brown *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Abba y Wink, 2009; Dueñas *et al.*, 2010) estaría de acuerdo con la teoría de que la producción excesiva de ROS causa daño a componentes celulares esenciales, como DNA y proteínas, siendo una causa principal del envejecimiento del organismo (Harman, 1973). Ensayos con células endoteliales de la vena umbilical humana también han demostrado que tanto epicatequina como sus derivados metilados pueden intervenir en el metabolismo oxidativo a través de su capacidad para inhibir la enzima NADPH oxidasa (Steffen *et al.*, 2008). El efecto protector que ejerce la catequina en los gusanos frente a estrés oxidativo también fue observado por Saul *et al.* (2009), quienes encontraron que en gusanos pre-tratados con catequina (200 μ M), sometidos a estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en el sexto día de adulto, aumentaba la tasa de supervivencia entre un 9% y 28%, en cinco ensayos independientes. Zhang *et al.* (2009), también mostraron una mayor protección en los gusanos sometidos a estrés oxidativo inducido por juglona (500 μ M) tratados previamente con EGCG a diferentes concentraciones (0,1 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 10,0 μ g/mL), observando un aumento en la tasa de gusanos vivos con respecto al control entre 88,5% y 178%, no siendo proporcional el aumento de la protección frente al estrés oxidativo con el aumento en la concentración de EGCG. Similares resultados fueron obtenidos por Abba y Wink (2009) y Brown *et al.* (2006), los cuales demostraron que los gusanos tratados con EGCG presentaban una atenuación significativa de los niveles intracelulares de H₂O₂ en *C. elegans*. Estos autores asociaron la mejor protección frente al estrés oxidativo de los gusanos tratados con EGCG con su elevada capacidad de captar radicales libres, superior a la del ácido ascórbico. Abba y Wink, (2010) también encontraron que el tratamiento con este flavanol reducía los niveles de lipofuscina en el intestino del gusano. Este pigmento es considerado como

un marcador del envejecimiento, también denominado como pigmento de la edad. Se ha observado que el estrés oxidativo promueve la formación de lipofuscina y que el tratamiento antioxidante previene su acumulación (Abba y Wink, 2010).

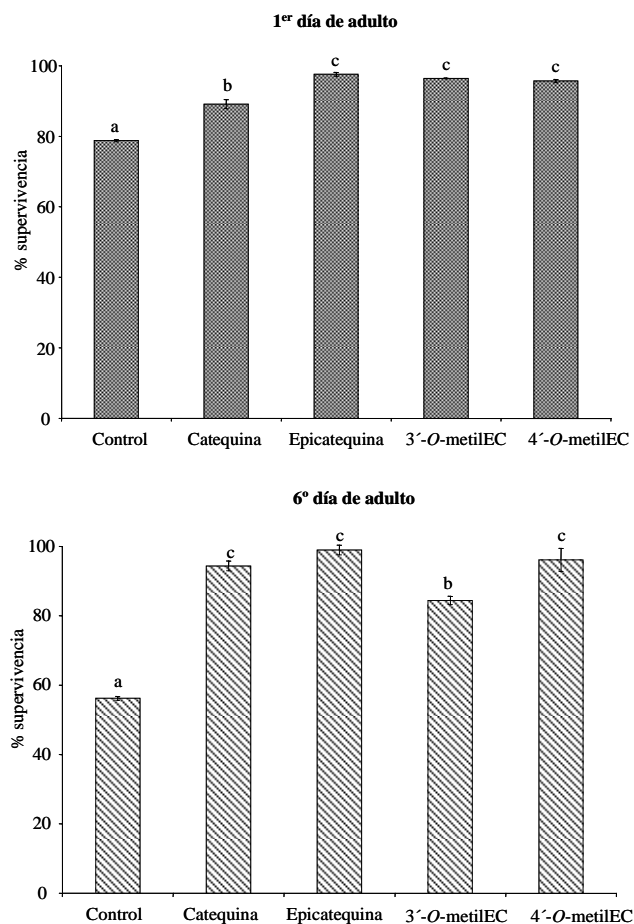


Figura VII.5. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sanos sometidos a estrés oxidativo inducido por juglona (150 μ M, 24 h, 20 $^{\circ}$ C) en el primer y sexto día de adulto tras pre-tratamiento con catequina, epicatequina, 3'-O-metilepicatequina y 4'-O-metilepicatequina (200 μ M). Los resultados corresponden en cada caso a la media de tres ensayos independientes.

También se ha observado que la proteína DAF-16, que en condiciones normales permanece en el citoplasma, tras tratamiento con EGCG, en condiciones de estrés oxidativo o térmico se transloca al núcleo (Abbas y Wink, 2010), lo que sugiere que ese flavanol podría actuar a través de la ruta de señalización de *daf-2*/insulina (Kimura *et al.*, 1997). El gen *daf-2* regula negativamente la expresión del gen *daf-16* que codifica el factor de transcripción DAF-16, una proteína que controla la actividad de otros genes que tienen un efecto prominente en la longevidad de *C. elegans* (Ogg *et al.*,

1997). Todos los organismos responden al estrés a nivel celular sintetizando proteínas de “shock” térmico, que protegen a las células de un posterior daño (Leroux *et al.*, 1997). Como se comentó en el apartado anterior, estas proteínas son altamente inducibles durante el estrés térmico y oxidativo, y la producción de las mismas está bajo el control de la ruta de señalización del *daf-2*/insulina, siendo consideradas un determinante de la vida media y resistencia al estrés en *C. elegans* (Tissenbaum y Ruvkun, 1998; Schaffitzel y Hertweck, 2006). La cantidad de estas proteínas disminuye en gusanos de más edad, dando lugar a un aumento en la proporción de proteínas desplegadas, originando como resultado que los gusanos sean más sensibles a las condiciones de estrés y produciendo un aumento en la mortalidad (Johnson *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2002). Abbas y Wink (2009, 2010) demostraron que el tratamiento con EGCG bajo condiciones de estrés oxidativo a pesar de disminuir la expresión de los genes *hsp-16.2* y *hsp-16.1*, que codifican HSPs, protegía las macro-moléculas del daño oxidativo. Estos autores concluían que la EGCG juega un rol importante en la protección contras las enfermedades relacionadas con la edad mediadas por ROS, el mecanismo de acción parece estar vinculado a la ruta de señalización *daf-2*/insulina y a la propiedad antioxidante de EGCG.

7.2.4. LONGEVIDAD

La Figura VII.6 muestra las curvas de supervivencia de los gusanos tratados con catequina, epicatequina, 4'-*O*-metilepicatequina y 3'-*O*-metilepicatequina comparadas con los gusanos control (sin tratamiento). Se puede observar que en una primera etapa (durante aproximadamente los 15 primeros días de desarrollo), la tasa de gusanos muertos era más alta en los gusanos cultivados en presencia de epicatequina que en los controles. Sin embargo, en etapas posteriores del desarrollo del gusano este efecto se invertía produciéndose un aumento significativo en la longevidad del animal en presencia de este compuesto. Sin embargo, durante todo el desarrollo de los animales se observa en las curvas de longevidad un claro efecto positivo de catequina, y los derivados metilados 3'-*O*-metilepicatequina y 4'-*O*-metilepicatequina, con respecto al control.

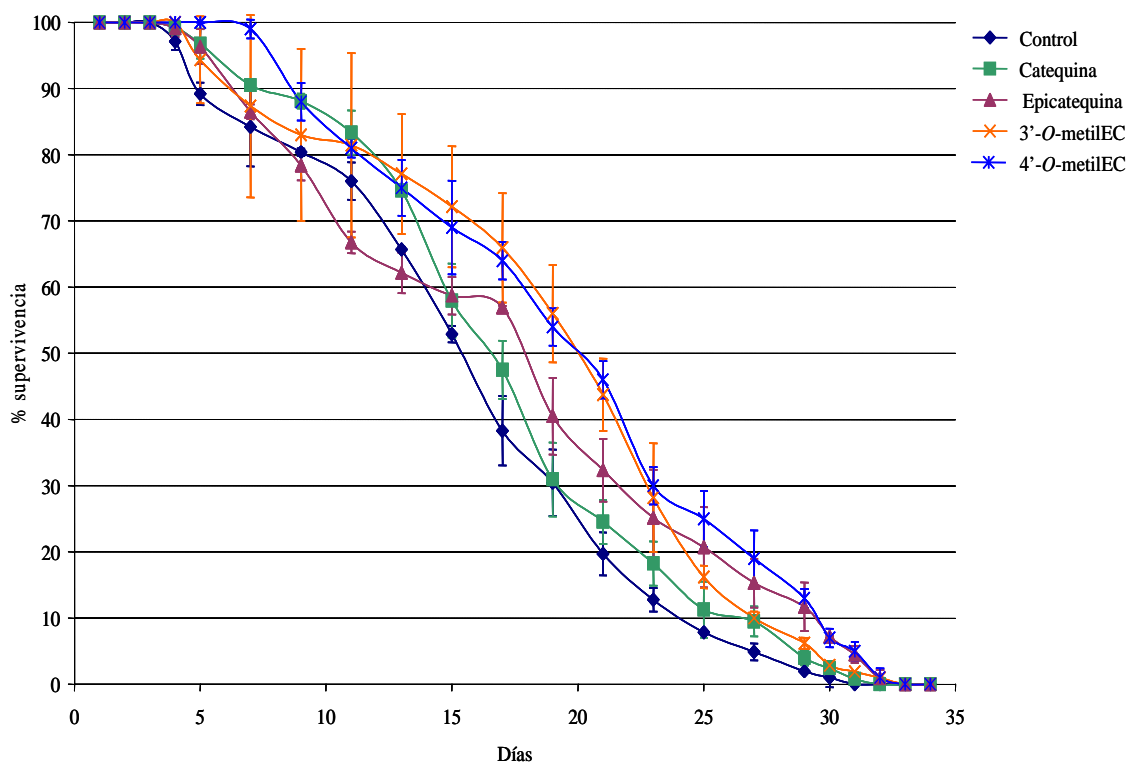


Figura VII.6. Curva de supervivencia de gusanos tratados con flavanoles

En la Tabla VII.1 se recogen los datos de vida media y máxima calculados según el análisis estadístico de Kaplan-Meier. También se refleja en esta tabla el tiempo de vida máximo calculado como el promedio de duración de vida del 10% de la población más longeva. Los tratamientos con los derivados metilados de epicatequina extendían el promedio de vida del gusano entre un 7 y 12%, con respecto al control, siendo 4'-O-metilepicatequina el que producía un mayor aumento en la vida media del animal. Los gusanos tratados con catequina y epicatequina no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control en el promedio de vida de los gusanos adultos. El tiempo de vida máximo del nematodo aumentaba significativamente en los tratamientos de epicatequina y 4'-O-metilepicatequina, alrededor de un 11%, con respecto al control.

Tabla VII.1. Influencia de catequina, epicatequina, 3'-O-metilepicatequina, 4'-O-epicatequina (200 μ M) sobre la duración de vida de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento a 20°C.

Tratamiento	Promedio (días)	Mediana (días)	Máximo 10% (días)	<i>p</i> vs control (<i>log rank</i>)
Control	17,4 \pm 0,5	18,0 \pm 0,6	28,1 \pm 0,1	
Catequina	17,0 \pm 0,4	16,0 \pm 0,5	28,6 \pm 0,8	0,668
Epicatequina	17,5 \pm 0,5	18,0 \pm 0,4	31,2 \pm 0,3	0,095
3'-O-metilepicatequina	18,7 \pm 0,5	20,0 \pm 0,6	29,2 \pm 0,1	0,021
4'-O-metilepicatequina	19,6 \pm 0,5	20,0 \pm 0,6	31,0 \pm 0,6	0,000

*Media \pm desviación estándar (n=3). ^aMáximo 10% = Tiempo promedio de vida máximo del 10% de la población más longeva. El test *log-rank* indica las diferencias en la vida media de un tratamiento con respecto al control (*p*<0,05).

Nuestros resultados son coherentes con los encontrados por Saul *et al.* (2009), quienes estudiaron la influencia de catequina (200 μ M) sobre la longevidad del gusano, observando que no había diferencias significativas en la duración de vida entre gusanos tratados con catequina hasta el sexto día de adulto frente al control. Sin embargo, se observaba un aumento en la vida media del gusano entre un 2,3 y 13%, en diferentes ensayos independientes, cuando se trataba de gusanos de generación F1, los cuales habían estado más tiempo expuestos a catequina. Este resultado sugería que una mayor exposición al flavonol redundaba en un aumento de la longevidad. Otros autores estudiaron la influencia de EGCG sobre la longevidad de *C. elegans*, encontrando discrepancias entre los resultados obtenidos. Brown *et al.* (2006), encontraron un aumento en la vida media y máxima en gusanos tratados con ácido lipoico pero no con EGCG en cepas silvestres de *C. elegans*. Estos autores llevaron también a cabo ensayos de longevidad con gusanos mutantes *daf-16*, para determinar el posible mecanismo de acción de los compuestos ensayados, observando que las curvas de supervivencia no mostraban diferencias significativas entre los gusanos mutantes alimentados con ácido lipoico o EGCG y los gusanos no tratados, lo que sugería que la extensión de la vida de los gusanos de la cepa silvestre tratados era dependiente la ruta de señalización de insulina/IGF-1. Esta ruta de

señalización es una de las rutas principales para controlar en el nematodo la reproducción, el crecimiento y la longevidad (Wolkow, 2002). La pérdida de la función de la mutación *daf-16* reduce la vida del gusano y a la vez suprime la extensión en la longevidad causada por mutaciones en genes de la ruta de señalización, como *daf-2* (Kenyon *et al.* 1993).

Diversos estudios han demostrado que el factor de transcripción DAF-16 regula un gran número de genes que aumentan la resistencia al estrés y extienden la vida media de los gusanos (Lin *et al.*, 1997; Partridge y Gems 2002; Lee *et al.*, 2003). El aumento en la longevidad y en la resistencia del estrés en *C. elegans* inducido por EGCG fue atribuido por Abba y Wink, (2009) a la inhibición del gen *daf-2* resultante de la migración de DAF-16 al núcleo y también a la inducción de la expresión del gen *igf-1* el cual promueve la longevidad y resistencia al estrés (Murphy *et al.*, 2003). Además, la localización nuclear de la proteína DAF-16 es esencial para la activación de varios genes, incluyendo los implicados en la producción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa y catalasa (Oh *et al.*, 2006).

Al igual que Brown *et al.* (2006), que no encontraron efecto de EGCG sobre la longevidad; Zhang *et al.* (2009) tampoco observaron efectos sobre la longevidad de gusanos silvestres ante la exposición a EGCG a distintas concentraciones (0,1; 1; 10 $\mu\text{g/mL}$) bajo condiciones normales de cultivo. Sin embargo, estos autores observaron un aumento en la longevidad en gusanos tratados con ese mismo flavonol cuando habían sido sometidos a estrés oxidativo. En ese trabajo, mediante PCR en tiempo real, se estudió si EGCG podía regular la expresión de los genes *daf-16*, *daf-2*, *sod-3* y *skn-1*, asociados con el envejecimiento. El factor de transcripción DAF-16 es un objetivo cascada de la señalización de insulina en *C. elegans*, indispensable tanto para la resistencia al estrés como para la regulación de la longevidad (Lin *et al.*, 2001). DAF-2 es una proteína receptora para la insulina e IGF-1, que señala la ruta PI3-quinasa actuando negativamente en la regulación de DAF-16 (Kenyon *et al.*, 1993; Dorman *et al.*, 1995). SOD-3 es uno de los efectores cascada de DAF-16, y es también un importante regulador de la longevidad y resistencia al estrés en *C. elegans* (Kenyon *et al.*, 1993; Dorman *et al.*, 1995; Braeckman y Vanfleteren, 2007). SKN-1 es otro factor de transcripción que puede regular positivamente la longevidad y la resistencia al estrés en *C. elegans* (Zhang *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos por Zhang *et al.* (2009), mostraron que EGCG sólo aumentaba la expresión de los genes *sod-3* y *skn-1*, y sugirieron que los efectos que mejoraban la longevidad de los gusanos tratados con este flavonol bajo condiciones de estrés podían atribuirse a su actividad antirradicalaria, tanto directa como indirectamente a través de la regulación de los genes asociados a la resistencia al estrés como *sod-3* y *skn-1*.

Abbas y Wink (2009) realizaron un estudio sobre la longevidad a distintas concentraciones de EGCG, observando que el intervalo óptimo de concentración para el aumento de la longevidad del gusano silvestre se situaba entre 200 y 400 μM . Estos autores también observaron un aumento en la vida del gusano para los mutantes *fem-1* y *mev-1* tratados con EGCG 220 μM y 55 μM respectivamente. La cepa *fem-1* es sensible a la temperatura y es estéril a 25 °C. Esta cepa es muy útil en ensayos de longevidad porque el crecimiento excesivo de la progenie puede ser evitado al aumentar la temperatura de incubación a 25 °C. La cepa *mev-1* muestra un acelerado envejecimiento porque su subunidad del citocromo b de la succinato deshidrogenasa (complejo II) de la cadena de transporte de electrones está mutada, y como consecuencia resulta una elevada acumulación de daño oxidativo durante el envejecimiento y sensibilidad al aumento de oxígeno (Ishii *et al.*, 2005). Estos autores sugieren que los efectos beneficios de EGCG se debe a que actúa como prooxidante/antioxidante y además las propiedades antioxidante pueden contribuir a los efectos de prolongación de la vida por otros caminos: inactivación de *daf-2* (Kenyon *et al.*, 1993) o restricción dietética (Klass, 1977).

En un estudio llevado a cabo por Sunagawa *et al.* (2011) se observó una extensión del 12% en la vida media de gusanos silvestres expuestos a un extracto de procianidinas (65 $\mu\text{g/mL}$) obtenido de manzanas. En el mismo trabajo se realizaron ensayos para estudiar la influencia del mismo extracto de procianidinas y de epicatequina (65 $\mu\text{g/mL}$) sobre la longevidad de tres mutantes: *fem-1*, *sir2-1* y *mev-1*. Se encontró que el tratamiento con epicatequina no ejercía efecto sobre la vida de los mutantes, sin embargo el extracto de procianidinas extendía la vida media en un 8% en los mutantes *fem-1*, mientras que no se observaron efectos sobre los mutantes *mev-1*. Los mutantes *mev-1* son gusanos de corta vida que no mostraban un aumento en la tasa de supervivencia cuando eran tratados con procianidinas en condiciones de estrés oxidativo, sugiriendo que la alta actividad antioxidante *in vitro* de las procianidinas no estaba unida a los efectos sobre longevidad en *C. elegans*. Iguales resultados se obtuvieron para los gusanos *sir2-1*, carentes de actividad de la proteína SIR-2, miembro de la familia de las sirtuinas, proteínas desacetilasas NAD^+ dependiente. Esto apuntaba a que las procianidinas extendían la vida media del gusano por medio de diferentes mecanismos, uno de ellos mediado por la regulación en la expresión del gen *sir2-1*. La segunda posibilidad podría ser la regulación del metabolismo de NAD , ya que éste es esencial para la actividad de la proteína SIR-2.

Otros estudios de longevidad llevados a cabo con mutantes *akt-2* mostraron que la catequina podría estar involucrada en los efectos de longevidad debido a una posible acción de la proteína AKT-2, independiente de la ruta de señalización de la

insulina (Saul *et al.*, 2009). Esta hipótesis fue apoyada por Quevedo *et al.* (2007), quienes demostraron que AKT-1 y AKT-2 regulan de forma negativa (e independiente de DAF-16) el daño de DNA inducido por la apoptosis en líneas germinales de *C. elegans*. Saul *et al.* (2009), también observaron que el gen *nhr-8* podría ser un potencial candidato en los cambios de longevidad ejercidos por catequina. Ésta podría ser capaz de activar la proteína NHR-8, que forma parte del sistema de biotransformación que controla el metabolismo de xenobióticos, aumentando de este modo la metabolización de posibles sustancias tóxicas. También podría ser que la propia catequina fuera un sustrato para la biotransformación por NHR-8 dando lugar a la formación de productos responsables de la longevidad. Los mismos autores concluyen que los beneficios de catequina sobre el gusano estarían más relacionados con un amplio espectro de desintoxicación que con una acción simple antioxidante, y podrían ligarse con la teoría del “soma disponible” (Gems y McElwee, 2005). De este modo, la energía adicional requerida para un aumento en la respuesta al estrés y mecanismos de defensa podría ser sustraída de la energía necesaria para el correcto crecimiento del gusano, de manera que los animales resultarían más cortos pero de vida más larga.

7.2.5. BIODISPONIBILIDAD DE FLAVANOLES

Se realizaron ensayos para establecer si los flavanoles eran captados y eventualmente metabolizados por *C. elegans*. Para este estudio los gusanos se incubaron a 20 °C en placas que contenían los distintos flavonoles, usando como fuente de alimento bacterias muertas para descartar que tuvieran alguna influencia en la incorporación y metabolismo de los compuestos. Los gusanos se recogieron al cabo de 4-6 días y se homogenizaron en metanol, como se describe en la sección de Materiales y Métodos (apartado 3.2.9). El análisis por HPLC de los extractos de homogenizados de gusanos (Figura VII.7) permitió confirmar que el gusano incorporaba y biotransformaba estos compuestos. En la tabla VII.2 se resumen los resultados de los análisis de HPLC-DAD-ESI/MS en los ensayos realizados con los distintos flavonoles, recogiendo la identificación tentativa de los metabolitos detectados.

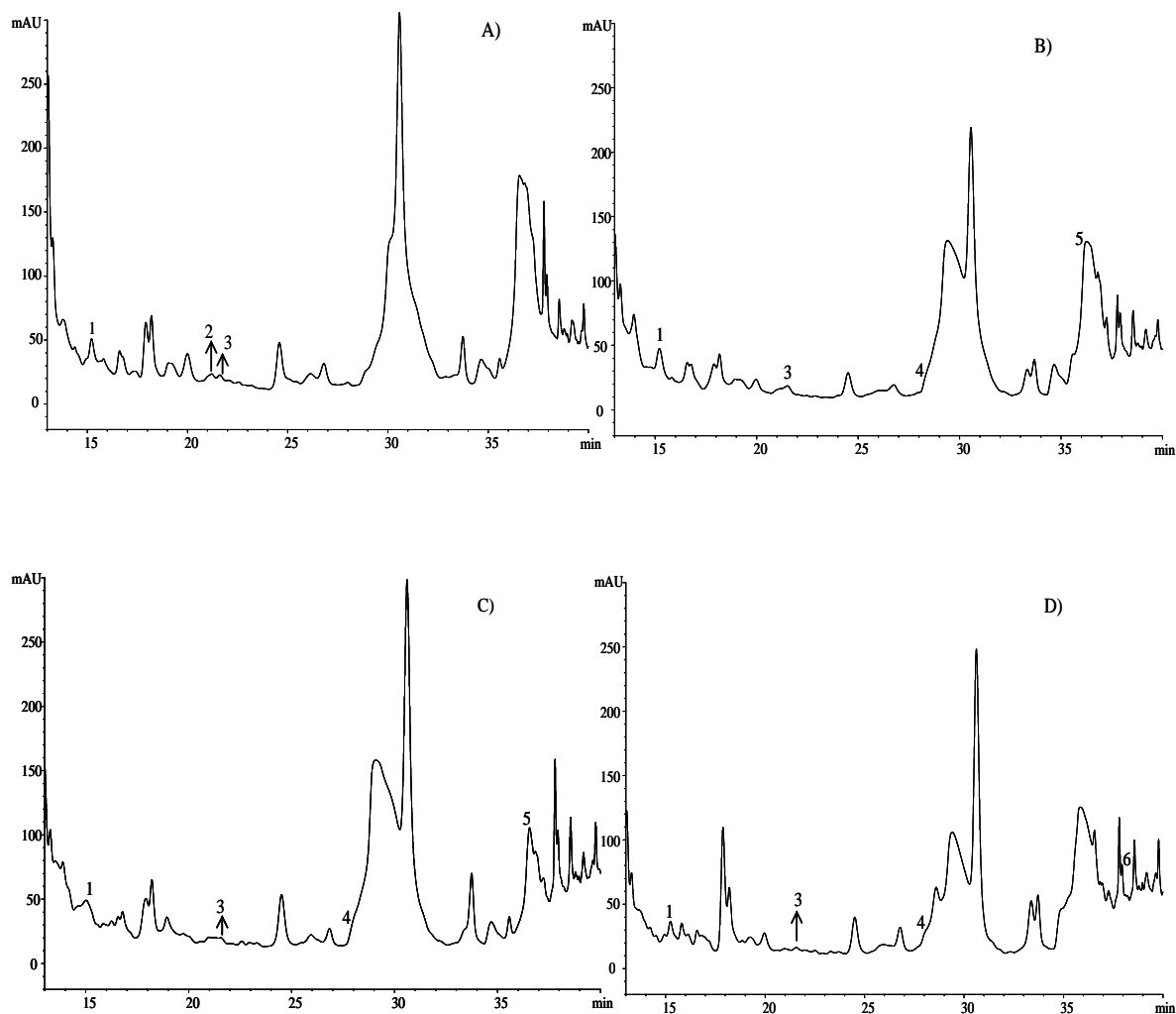


Figura VII.7. Cromatogramas (zoom) de HPLC registrados a 280 nm correspondientes a extractos obtenidos de homogeneizados de *C. elegans* previamente cultivados en presencia de: (A) catequina, (B) epicatequina, (C) 3'-*O*-metilepicatequina y D) 4'-*O*-metilepicatequina.

Las características cromatográficas y espectrales del pico 2 permitieron identificarlo como catequina, identidad que fue confirmada positivamente por comparación con un patrón comercial. La presencia de este compuesto confirmaba la captación del flavanol por parte del gusano, e igual observación era realizada en los ensayos realizados con epicatequina (pico 4) y los dos derivados metilados (picos 5 y 6), que eran detectados en sus respectivos ensayos (Tabla VII.2).

Además de en el ensayo con epicatequina el pico 4 era también detectado en los extractos de los gusanos cultivados con los dos flavonoles metilados, indicando la existencia de actividad desmetilante por parte de *C. elegans*. Por otra parte, la

identificación de 3'-*O*-metilepicatequina en los gusanos tratados con epicatequina sugiere la existencia de actividad metil-transferasa en el nematodo, como ya se propuso en el apartado 5.2.5, donde se trataba la biodisponibilidad de flavonoles por parte de *C. elegans*.

Además de los anteriores se detectaron otros dos picos (1 y 3) que se asociaron a metabolitos de catequinas, ya que no eran observados en los ensayos control. El pico 1 mostraba un espectro con un máximo de absorción a 280 nm, y en el análisis de espectrometría de masas se observó un ion pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 181, que daba lugar a un fragmento de m/z 137 (-44 amu), correspondiente a la pérdida de un grupo CO_2 . El pico 3 presentaba un espectro UV λ_{max} a 277 nm y un ion pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 151, que liberaba un fragmento de m/z 107 (-44 amu, pérdida de CO_2). De acuerdo con estos resultados, los picos 1 y 3 fueron identificados como ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico y ácido 3-hidroxifenilacético, respectivamente, lo que fue también corroborado por comparación de sus tiempos de retención y características espectrales con patrones comerciales. Estos compuestos también fueron detectados en los tratamientos con epicatequina y con los dos flavanoles metilados. Está descrito que este tipo de ácidos fenólicos se forman como resultado de la ruptura del anillo C de catequinas y otros flavonoides como resultado del catabolismo por acción de la microflora intestinal en organismos superiores (Aura, 2008; Selma *et al.*, 2009).

Estos estudios permiten confirmar que los flavanoles son incorporados y biotransformados por *C. elegans*, dando lugar a la formación de nuevos metabolitos, particularmente formas metiladas y ácidos fenólicos de bajo peso molecular, como los producidos en el organismo humano por acción de la microflora del colon. En el caso de *C. elegans* la formación de estos ácidos fenólicos sugiere la existencia en su metabolismo de sistemas enzimáticos propios capaces de producir la degradación de los flavanoles.

El tipo de estudio realizado y los resultados obtenidos no permiten realizar una estimación cuantitativa del grado de incorporación de las catequinas por parte del gusano, si bien éste parece bajo. Aún así, éste debería explicar los efectos observados sobre la longevidad y resistencia al estrés de *C. elegans*. Son, por tanto, necesarios estudios adicionales para concluir sobre estos aspectos, así como sobre los mecanismos últimos implicados en estos efectos.

Tabla VII.2. Características cromatográficas y espectrales e identificación tentativa de metabolitos en los ensayos realizados con los diferentes flavanoles

Pico	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻	Fragmentos (m/z)	Identificación tentativa	Ensayo
1	15,2	280	181	137	Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico	Cat, Epic, 3'Mepic, 4'Mepic
2	21,6	278	289	-	Catequina	Cat
3	22,5	277	151	107	Ácido 3-hidroxifenilacético	Cat, Epic, 3'Mepic, 4'Mepic
4	29,1	279	289	-	Epicatequina	Epic, 3'Mepic, 4'Mepic
5	36,2	278	303	-	3'-O-metilepicatequina	Epic, 3'Mepic
6	37,8	278	303	-	4'-O-metilepicatequina	4'Mepic

Cat: Catequina, Epic: Epicatequina, 3'Mepic: 3'-O-metilepicatequina; 4'Mepic 4'-O-metilepicatequina

7.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en los estudios realizados ponen de manifiesto que los tratamientos con (epi)catequina y metabolitos metilados no afectan significativamente al tamaño del gusano y en su capacidad reproductiva, sugiriendo que los mismos a las concentraciones ensayadas no alterarían ninguna ruta de señalización con efecto sobre dichas características fenotípicas.

Sin embargo, los tratamientos con estas catequinas aumentan la resistencia de *C. elegans* frente a estrés térmico y oxidativo. En el primer día de adulto, es el tratamiento con epicatequina el que produce un mayor efecto protector frente al estrés térmico; mientras que en el estrés oxidativo la mayor resistencia es conferida tanto por epicatequina como por sus derivados metilados. El porcentaje de supervivencia de los gusanos tratados con flavanoles sometidos a estrés en el sexto día de adulto es superior que en los sometidos a estrés en el primer día de adulto. En esa etapa avanzada de desarrollo, los derivados metilados son los que más aumentan la resistencia de los gusanos frente a la temperatura. Sin embargo, con respecto al estrés oxidativo es el tratamiento con epicatequina el que presenta un mayor efecto protector, con respecto a los gusanos sin tratar.

Los tratamientos con los derivados metilados de epicatequina prolongan significativamente la vida media del gusano, siendo 4'-*O*-metilepicatequina el que aporta una mayor extensión en la vida media del gusano. Sin embargo, no se encontró efecto de catequina y epicatequina sobre la longevidad, sugiriendo que la mejora en la resistencia frente a estrés oxidativo no está necesariamente relacionada con los efectos sobre la longevidad, que estarían, por tanto, mediados por mecanismos diferentes.

Los estudios realizados han permitido establecer que las catequinas y sus derivados metilados son captados por el nematodo y parcialmente biotransformados a metabolitos metilados, así como también degradados hacia productos de menor peso molecular, como ácidos fenólicos similares a los producidos a partir de flavonoides por la microflora intestinal en el organismo humano.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. Se optimizaron las condiciones de incorporación y estabilidad en los medios de cultivo de los distintos flavonoides estudiados. Se pudo comprobar que los compuestos permanecían estables en los medios, sin que se produjera separación de los mismos, pérdidas significativas de concentración o aparición de posibles productos de degradación a lo largo del tiempo de ensayo. Asimismo, se confirmó que el uso de bacterias muertas, como fuente de alimento de los gusanos, no afectaba a la captación y posible biotransformación de los compuestos.
2. Los tratamientos con quercetina a la dosis ensayada inducen un aumento en el tamaño del gusano así como en su capacidad reproductiva. Sin embargo, los tratamientos con catequinas o con derivados metilados, ya sean de quercetina o de epicatequina, no ejercen ningún efecto sobre dichas características. La realización de análisis por PCR en tiempo real no permitió concluir si el efecto sobre la reproducción observado para quercetina estaba relacionado con una influencia sobre el metabolismo estrogénico, evaluado a partir de la expresión del gen *let-767*.
3. La resistencia de *C. elegans* frente a estrés oxidativo y térmico es mejorada en los tratamientos con todos los flavonoides ensayados. El aumento relativo en la tasa de supervivencia es mayor cuando los gusanos son sometidos a estrés en el sexto día de adulto que en el primer día, lo que podría ser explicado por haber permanecido más tiempo en contacto con los compuestos, así como por la posible relación entre resistencia al estrés y expectativas de vida. La realización de análisis OxyBlot™ permitió comprobar la existencia de una menor tasa de oxidación de proteínas en los gusanos tratados con flavonoles, por lo que los efectos protectores observados frente al estrés oxidativo podrían estar relacionados con su capacidad antioxidante y captadora de radicales libres.
4. Quercetina y epicatequina poseen en general mayor eficacia en la protección frente a estrés oxidativo que sus derivados metilados. Este efecto es coherente con la disminución en la capacidad antioxidante que normalmente es producida por la metilación de los flavonoides encontrada en otros estudios. Los derivados metilados son, sin embargo, igual o más eficaces que los no metilados en aumentar la resistencia frente a estrés térmico. Esta observación sugiere que ambos tipos de efectos (resistencia a estrés térmico y a estrés oxidativo) estarían mediados, al menos en parte, por mecanismos diferentes.

5. Tanto quercetina como sus derivados metilados y los derivados metilados de epicatequina prolongan la duración media de vida de *C. elegans*, siendo isoramnetina y 4'-*O*-metilepicatequina los que conducen a mayor longevidad. Sin embargo, catequina y epicatequina no ejercían ningún efecto sobre el promedio de vida de los gusanos adultos. Las diferencias encontradas en cuanto a efectos inducidos por los diferentes compuestos en los estudios de longevidad y de resistencia al estrés sugieren que estos procesos estarían basados en mecanismos diferentes.
6. La exposición del gusano a quercetina 3-*O*-glucósido (Q3G) a concentraciones en el medio inferiores a 50 μ M da lugar a efectos sobre longevidad y estrés térmico que se pueden considerar beneficiosos, de tipo similar a los observados en los ensayos con quercetina a una concentración de 200 μ M. Sin embargo, el tratamiento con Q3G a concentraciones de 50 μ M o superiores conduce a efectos tóxicos, que se traducen en una disminución en la longevidad y la resistencia frente al estrés térmico y oxidativo. Una posible explicación podría estar en que Q3G es captado de manera más eficaz por parte de *C. elegans* que quercetina, para ser posteriormente desglicosilado; de este modo en el interior del gusano se alcanzan mayores niveles de quercetina en los tratamientos con el glucósido. Si se tiene en cuenta que la quercetina puede presentar no sólo acción antioxidante sino también prooxidante, más acusada a concentraciones más altas, ello podría explicar los efectos tóxicos observados para el glucósido en las mayores dosis ensayadas. Esta explicación supondría asumir que es la quercetina el principal responsable de los efectos encontrados.
7. Mediante análisis de HPLC-DAD-MS se pudo confirmar la incorporación y biotransformación de todos los compuestos estudiados por parte de *C. elegans*
 - Se comprobó que la quercetina y sus derivados metilados (isoramnetina y tamarixetina) eran parcialmente biotransformados a diferentes metabolitos glicosilados, sulfatados y metilados. La cuantificación en el nematodo de los niveles de estos flavonoles y sus metabolitos indicaba una mayor biodisponibilidad de quercetina que de sus derivados metilados.
 - Quercetina-3-*O*-glucósido es captado por el gusano de manera más eficaz que quercetina, y posteriormente desglicosilado y parcialmente conjugado hacia diferentes metabolitos glicosilados, sulfatados y metilados. La existencia de capacidad desglicosilante por parte del gusano fue confirmada mediante ensayos realizados con mutantes inducidos que carecían de actividad β -glucosidasa.

- Los flavanoles catequina, epicatequina y sus derivados metilados son también incorporados por el nematodo y parcialmente transformados a metabolitos metilados, y también degradados hacia compuestos fenólicos de bajo peso molecular, como ácidos fenólicos similares a los que se producen por la microflora intestinal en el organismo humano tras la ingesta de flavonoides. Aunque no pudieron cuantificarse los niveles de estos compuestos en el nematodo, la tasa de incorporación de catequinas por el gusano es aparentemente inferior a la de quercetina y los otros flavanoles ensayados.

Los estudios recogidos en esta memoria han constituido para nuestro grupo la apertura de una nueva línea de investigación, y los resultados obtenidos representan una primera etapa en la evaluación de los efectos y mecanismos de acción de los flavonoides en el modelo *C. elegans*. Son, por tanto, un punto de partida al que se está dando actualmente continuidad mediante la realización de estudios que nos permitan establecer los compuestos últimos responsables de los efectos producidos y los mecanismos de acción implicados a nivel celular y molecular. Así, entre otros, se están ya realizando ensayos para la evaluación de diferentes actividades enzimáticas relacionadas con estrés oxidativo o de ultrasecuenciación en *C. elegans* tratados con los compuestos estudiados. Todo ello sin perder de vista el objetivo final realmente perseguido que es contribuir a explicar los efectos de este tipo de fitoquímicos de la dieta en el organismo humano y su posible relación con la protección de enfermedades crónicas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S. and Wink, M. Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signalling pathway. *Phytomedicine*. (2010), 17, 902-909.
- Abbas, S. and Wink, M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Medica*. (2009), 75, 216-221.
- Ader, P.; Block, M.; Pietzsch, S.; Wolfram, S. Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer letters* (2001), 162, 2, 175-180.
- Afanas'ev, I.B.; Dorozhko, A.I.; Brodskii, A.V.; Kostyuk, A.; Potapovich, A.L. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*. (1989), 38, 1763-1769.
- Ahmad, R.; Ali, A.M.; Israf, D.A.; Ismail, N.H.; Shaari, K.; Lajis, N.Hj. Antioxidant, radical scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. *Life Science*. (2005), 1953-1964.
- Alcalde-Eon, C; Saavedra, G.; de Pascual-Teresa, S.; Liquid chromatography-mass spectrometry identification of anthocyanins of isla oca (*Oxalis tuberosa*, Mol.) tubers. *Journal of Chromatography American*. (2004), 1054, 1-2, 211-215.
- An, J.H. and Blackwell, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Gene Development*. (2003), 17, 1882-1893.
- Andersen, O.M. How easy is it nowadays to analyse anthocyanins? En: Polyphenols 2000. Martens, S.; treutter, D.; Forkmann, G. (Editores). Editorial Technische Universität München. *Freising-Weihenstephan (Alemania)* (2002), 49.
- Andersen, O.M. En: Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and applications. Andersen, O.M.; Markham, K.R. (Editores). *Editorial Taylor & Francis Group* (London) (2006), 1129.
- Anderson, Philip. Mutagenesis in Methods. In Cell Biology. Eds. Henry Epstein and Diane Shakes. *Academic Press* (1995), p. 32.
- Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; Donald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. (2002), 127, 183-198.
- Arteel, G.E.; Schroeder, P.; Sies, H. Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers, *Journal of Nutrition*. (1999), 130, 8, 2100s-2104s.
- Arts, I.C.; Hollman, P.CH.;, Feskens, E.J.M. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *American Journal of Clinical Nutrition*. (2001), 74, 2, 227-232.

- Arts, I.C. A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoides, and lung cancer. *Journal Nutrition*. (2008), 138, 1561S-1566S.
- Aura, A.M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*. (2008), 7, 407-429.
- Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Terao, J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 beta-8)-epicatechin] in rats. *Free Radical Biology and Medicine*. (2002), 33, 142-148.
- Balaban, R.S.; Nemoto, S.; and Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. (2005), 120, 483-495.
- Bany, A.; Dong, M-Q.; and Koelle, M.R. Genetic and Cellular Basic for Acetylcholine Inhibition of *Caenorhabditis elegans* Egg-laying Behavior. *The Journal of Neuroscience*. (2003), 23(22), 8060-8069.
- Bass, T.M.; Weinkove, D. Houthoofd, K.; Gems, D.; Partridge, L. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2007), 128, 546-552.
- Bate-Smith, E. C.; Metcalfe, C. R. Leuco-anthocyanins 3. The nature and systematic distribution of tannins in dicotyledonous plants. *Botanical journal of the Linnean Society, Londres*. (1962), 55, 669-705.
- Baumeister, R.; Schaffitzel, E.; Hertweck, M. Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *Journal endocrinology*. (2006), 190, 191-202.
- Beckman, K.B and Ames, B.N. The free radical theory of aging matures. *Annual Review of Physiology*. (1998), 78(2), 547-581.
- Benzie, I.F.F.; Szeto, Y.T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal Agriculture Food and Chemistry*. (1999), 47, 633-636.
- Berninsone, Patricia M. Carbohydrates and glycosylation (December 18, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, <http://www.wormbook.org>. Disponible 5/2010.
- Bianchi, L.; Diez-Sampedro, A. A Single Amino Acid Change Converts the Sugar Sensor SGLT3 into a Sugar Transporter. *PLOS ONE*. (2010), 5, 4, e10241.
- Bolanowski, M.; Russell, R.; Jacobson, L. Quantitative measures of aging in the *Caenorhabditis elegans*. I. Population and longitudinal studies of two behavior parameters. *Mechanisms of Ageing and Development*. (1983), 15, 279-295.

- Bolla, R. Nematode energy metabolism. In *Nematodes as Biological Models* (Vol. 2), B.M. Zuckermann, ed. (New York: Academic Press) (1980), 165-192.
- Bomser, J.A.; Singletary, K.: Effect of grape seed polyphenolic (GSP) extract on TPA-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity protein expression and kinetics in mouse skin epidermis. *Faseb Journal*. (1999), 13, 5, A919-A919.
- Bors, W.; Heller, W.; Michael, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymology*. (1990), 186, 343-355.
- Bors, W.; Michael, C.; Schikora, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radical Biology and Medicine*. (1995), 19, 45-52.
- Boots, A.W.; Wilms, L.C.; Swennen, E.L.R.; Kleinjans, J.C.S.; Bast, A.; Haenen, G.R.M.M.; In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. *Nutrition*. (2008), 24, 7-8, 703-710.
- Bradford M, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. (1976), 72, 248-254.
- Braeckman, B.P.; Vanfleteren, J.R. Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Experimental Gerontology*. (2007), 42, 90-98.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Ledensm. Wiss. Uu. Technology*. (1995), 28, 25-30.
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. (1974), 77, 71-94.
- Brewer Gregory. J. Epigenetic oxidative redox shift (EORS) theory of aging unifies the free radical and insulin signaling theories. *Experimental Gerontology*. (2010), 45, 173-179.
- Brown, M.K.; Evans, J.L.; Luo, Y. Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and alpha lipoic acid on lifespan and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. (2006), 85, 620-628.
- Brouillard, R. Chemical structure of anthocyanins. In *Anthocyanins as Food Colors*. Pericles Markakis (Ed). Academic Press. (1982), 1-40
- Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (1993), 300, 535-543.
- Caffaro, C.E. and Hirschberg, C.B. Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus: from Basic science to diseases. *Accounts of Chemical Research*. (2006), 39, 805-812.

- Caffaro, C.E.; Luhn, K.; Bakker, H.; Vestweber, D.; Samuelson, J.; Berninsone, P.; Hirschberg, C.B. A single *Caenorhabditis elegans* golgi apparatus-type transporter of UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-N-acetylglucosamine, and UDP-N-acetylgalactosamine. *Biochemistry*. (2008), 47, 14, 4337-4344
- Cao, Z.M.; Wu, Y.J.; Curry, K. Ginkgo biloba extract EGb 761 and Wisconsin ginseng delay sarcopenia in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Gerontology series A-Biological Sciences and Medical Sciences*. (2007), 62, 12, 1337-1345.
- Carbonaro, M. and Grant, G. Absorption of quercetin and rutin in rat small intestine. *Annals of Nutrition and Metabolism*. (2005), 49, 3, 178-182.
- Céspedes, M.E.; Rodríguez C. K.; Llopiz J.N.; Cruz, M.N. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Revista Cubana Biomedica*. (2000); 19(3): 189-90.
- Chateau, M.T.; Araiz, C.; Descamps, S.; Galas, S. Klotho. interferes with a novel FGF-signalling pathway and insulin/IGF-like signalling to improve longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging-us*. (2010), 2, 9, 567-581.
- Chen, T.j.; Jeng, J.Y.; Lin, C.W.; Wu, C.Y.; Chen, Y.C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* (2006), 223, 113-126.
- Cheyrier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrición*. (2005), 81(1), 223S-229S.
- Chondrogianni, N.; Kapeta, S.; Chinou, I.; Vassilatou, K.; Papassideri, I.; Gonos, E.S. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin *Experimental Gerontology*. (2010), 45, 10, SI, 763-771.
- Conradt, B. and Xue, D. Programmed Cell Death (October 06, 2005) WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook. 1.32.1, <http://www.wormbook.org>.
- Cook, N.S. and Samman, S. Flavonoids Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*. (1996), 7, 2, 66-76.
- Crawford, D.L.; Sinnhuber, R.O. and Aft, H. the effect of methylation upon the antioxygenic and chelating capacity of quercetin and dihydroquercetin in Lard substrate. *Journal Food Science*. (1960), 26, 139-145.
- Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Demigne, C.; Remesy, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2002), 50, 3, 618-621.

- Croll, N.A.; Smith, J.M.; and Zuckerman, B.M. The aging process of the nematode *Caenorhabditis elegans* in bacterial and axenic culture. *Experimental Aging Research*. (1977), 3, 175-189.
- Crowden, R.K.; Jarman, S.J. 3-Deoxyanthocyanins from Fern *Blechnum-Procerum*. *Phytochemistry*. (1974), 13(9), 1947-1948.
- Curran, S.P.; Leverich, E.; Koehler, C.M.; Larsen, P.L. Defective mitochondrial protein translocation precludes normal *Caenorhabditis elegans*. *Development. Journal Biological Chemistry*. (2004), 279, 52, 54655-54662.
- Das, N.P.; Sothy, S.P. Studies on flavonoid metabolism - biliary and urinary excretion of metabolites of (+)-[u-c-14]catechin. *Biochemical Journal*. (1971), 125, 2, 417.
- Day, A.J.; DuPont, M.S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M.J.C.; Morgan, M.R.A.; Williamson, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *Febs letters*. (1998), 436, 1, 71-75.
- Day, A.J.; Canada, F.J.; Diaz, J.C.; Kroon, P.A.; Mclauchlan, R.; Faulds, C.B.; Plumb, G.W.; Morgan, M.R.; Williamson, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *Febs letters*. (2000), 468, 166-170.
- Day, A.J.; Bao, Y.P.; Morgan, M.R.A.; Williamson, G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine*. (2001), 29, 12, 1234-1243.
- De Castro, E.; de Castro, S.H.; Johnson, T.E. Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone. *Free Radical Biology and Medicine*. (2004), 37, 139-145.
- De Grey, A.D. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *Bioessays*. (1997), 19, 161-166.
- De Grey, A.D. The reductive hotspot hypothesis: an update. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (2000), 373, 295-301.
- De Jong, W.W.; Caspers, G.J.; Leunissen, J.A.; Genealogy of the alpha-crystalline-small heat-shock protein superfamily. *Int. Journal Biology Macromolecular*. (1998), 22, 151-162.
- Deng, D.; Zhang, J.; Cooney, J.M.; Skinner, M.A.; Adaim, A.; Jensen, D.J.; Stevenson, D.E. Methylated polyphenols are poor "chemical" antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Febs Letters*. (2006), 580, 5247-5250.

- De Pascual-Teresa, S.; Treutter D, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga Cter, D.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C: Analysis of flavanols in beverages by high-performance liquid chromatography with chemical reaction detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1998), 46, 10, 4209-4213
- De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2000), 48 (11), 5331-5337
- De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2001), 48, 5331-53.
- De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (2002), 82, 9, 1003-1006.
- Déprez, S.; Brezillon, C.; Rabot, S.; Philippe, C.; Mila, I.; Lapiere, C.; Scalbert, A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *Journal of Nutrition*. (2000), 130, 11, 2733-2738.
- Desnoyer, S.; Blanchard, P.G.; St-Laurent, J.F.; NGagnon, S.; Baillie, D. and Luu-The, V. *Caenorhabditis elegans* LET-767 is able to metabolize androgens and estrogens and likely shares common ancestor with human types 3 and 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Journal of Endocrinology*. (2007), 195, 271-279.
- Devia, B.; Ilabres, G.; Wouters, J.; Dupont, I.; Escribano-Bailon, M.T.; De Pascual-Teresa, S.; Angenot, L.; Tits, M. New 3 deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochemical Analysis*. (2002), 13(2), 114-120
- Donald, D.L. (ed.). *C. elegans* II. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1997).
- Donovan, J.L.; Bell, J.R.; Kasim-Karakas, S.; German, J.B.; Walzem, R.L.; Hansen, R.J.; Waterhouse, A.L. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *Journal of Nutrition*. (1999), 129, 9, 1662-1668.
- Dorman, J.B.; Albinder, B.; Shroyer, T.; Kenyon, C. The *age-1* and *daf-2* genes function in common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* (1995), 141, 1399-1406.
- Dueñas, M.; Gonzáles-Manzano, S.; Gonzáles-Paramás, A.; Santos-Buelga, S. Antioxidants evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2010), 51, 443-449.

Escribano-Bailon, M.T.; Santos-Buelga, C. Polyphenol extraction from foods. En: Methods in Polyphenol Analysis. Santos-Buelga C. and Williamson G. (Ed.) *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*. (2003), p1.

Esterbauer, H.; Striegl, G.; Puhl, H. and Rotheneder, M. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communications*. (1989), 6, 67-75.

Fernández-Pachón, M.S.; Villaño, D.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*. (2004), 513, 113-118.

Ferrerres, F.; Gil, M.I.; Castaner, M.; Tomas-Barberan, F.A. Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1997), 45, 11, 4249-4254.

Finch, C.E.; Ruvkun, G. The genetics of aging. *Annual Review of Genomics and Human Genetic*. (2001), 2, 435-462.

Finkel, T.; Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* (2000), 408: 239-247.

Fisher, N.D.; Hughes, M.; Gerhard-Herman, M.; Hollenberg, N.K. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of Hypertension*. (2003), 21, 2281-2286.

Fisher, K.; Southall, S. M.; Wilson, J.R.; Poulin, G.B. Methylation and demethylation activities of *C. elegans* MLL-Like complex attenuate RAS signaling. *Developmental Biology*. (2010), 142-153.

Fitch, D. H. Introduction to nematode evolution and ecology. (june 2005). WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook. 1.19.1, <http://www.wormbook.org>.

Fogliano, V.; Verde, V.; Randazzo, G.; Ritieni, A. Methods for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of Wines. *Journal Agriculture and. Food Chemistry*. (1999), 47, 1035-1040.

Fraga, C.S. Plant Phenolics and Human Health, John Wiley and Sons, Hoboken, USA, 2009.

Fraga, C.S.; Galleano, M.; Verstraeten, S.V.; Oteiza, P.I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*. (2010), 31, 6, 435-445.

Frankel, E.N., In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science and Technology*. (1993), 4, 220-225.

Galindo P, Rodríguez-Gómez I, González-Manzano S, Dueñas M, Jiménez R, Menéndez C, Vargas F, Tamargo J, Santos-Buelga C, Pérez-Vizcaino F, Duarte J Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *Molecular Nutrition and Food Research* (enviado para publicación).

García Alonso M., Estudio de la biodisponibilidad y actividad biológica de antocianos y pigmentos derivados del vino. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca- España (2006).

Garigan, D.; Hsu, A.L.; Fraser, A.G.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Kenyon, C. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*. (2002), 161, 1101-1112.

Gems David. Longevity and ageing in parasitic and free-living nematodes. *Biogerontology*. (2000), 1: 289-307

Gems, D. and Riddle, D.L. Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Gerontology* (2000), 55, 393-401.

Gem, D.; McElwee, J.J. Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? *Mechanisms of Ageing and Development*. (2005), 126, 3, 381-387.

Gerstbrein, B.; Stamatas, G.; Kollias, N.; Driscoll, M. In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. (2005), 4, 127-137.

González Manzano, S., Antocianos y flavanoles en uvas y vino. Influencia de la Composición en los procesos de copigmentación y estabilidad del color. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca-España (2007).

González-Manzano, S.; González-Paramás, A.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M. Preparation and Characterization of Catechin Sulfates, Glucuronides, and Methylethers with Metabolic Interest. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. (2009), 57 (4), 1231-1238.

Golden, T. R. and Melov, S. Changing of genetic expression association with ageing in *C. elegans*. (february 12, 2007) WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.127.2, <http://www.wormbook.org>.

Graefe, E.U.; Wittig, J. Mueller, A.K.; Riethling, A.K.; Uehleke, B.; Drewelow, B. Pforte, H.; Jacobasch, G.; Derendorf, H.; Veit, M.; Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*. (2001), 41, 492-499.

Griffiths, H.R. ROS as signaling molecules in T cells- evidence for abnormal redox signaling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. *Redox Report*. (2005), 10, 273-280.

Griffitts, J.S.; Hoffman, D.L.; Whitacre, J.L.; Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *Journal of Biological Chemistry*. (2003), 278, 46, 45594-45602.

Gruber, J. Ng, L.F.; Poovathingal, S.K.; Halliwell, B: Deceptively simple but simply deceptive - *Caenorhabditis elegans* lifespan studies: Considerations for aging and antioxidant effects. *Febs Letters*. (2009), 583, 21, 3377-3387.

Guarante, L., and Kenyon, C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*. (2000), 408, 255-262.

Guerardel, Y.; Balanzino, L.; Maes, E.; Leroy, Y.; Coddeville, B.; Oriol, R.; Strecker, G. The nematode *Caenorhabditis elegans* synthesizes unusual O-linked glycans: identification of glucose-substituted mucin-type O-glycans and short chondroitin-like oligosaccharides. *Biochemical Journal*. (2001), 357, 167-182.

Gugler, R.; Leschik, M.; Dengler, H.J. Disposition of Quercetin in man after single oral and intravenous doses. *European Journal of Clinical Pharmacology*. (1975), 9, 2-3, 229-234.

Gumienny, T.L.; Lambie, E.; Hartwig, E.; Horvitz, H.R. and Hengartner, M.O. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development*. (1999), 126, 1011-1022.

Gutteridge, J.M.C.; Halliwell, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. (1990), 15, 129-135.

Halliwell, B.; Murcia, M.A.; Chirico, S.M.; Aruoma, O.I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (1995), 35, 7-20.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. Free Radicals Biology and Medicine. 3rd ed. (Oxford: Oxford University Press) (1999).

Halliwell, B. Effect of diet on cancer development: Is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine*. (2002), 32, 10, 968-974.

- Halliwel, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (2008), 476, 107-112.
- Harborne, J. B. Comparative Biochemistry of Flavonoids. 2. 3 Desoxyanthocyanins and their systematic Distribution in Ferns and Gymnosperms. *Phytochemistry*. (1996), 5(4), 589-595.
- Harborne, J.B.; Grayer, R.J. Flavonoids and insects. En the flavonoids- Advances in research since 1986. (HARBONE, J.B., Ed.); Chapman and Hall: London, U.K., 1992.
- Harman, D. Free radical theory of aging. *Triangle*(1973), 12, 153-158,
- Haslam, E. Plant polyphenols. Vegetables tannins revisited. Cambridge University Press (1989), 230 pp.
- Haslam, E. Plant polyphenols (vegetable tannins)-Gallic Acid Metabolism. *Natural Product Reports* (1994), 11 (1), 41-66.
- Hattori, K.; Inoue, M.; Inoue, T. A novel sulfotransferase abundant expressed in the dauer larvae of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biochemistry*. (2006), 139, 3, 358-362.
- Heiss, C.; Finis, D.; Kleinbongard, P.; Hoffmann, A.; Rassaf, T.; Kelm, M.; Sies, H. J. Sustained increased in flow-mediated dilation after daily intake of high flavonol cocoa drink over 1 week. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. (2007), 49, 74-80.
- Hemingway, R. W. Reaction at the interflavonoid bond of proanthocyanidins. In: Chemistry and significance of condensed tannins; Hemingway, R. W. Karchesy, J.J., Eds.; Plenum Press, New York, NY, (1989), 345 - 368.
- Henderson, S.T. and Johnson, T.E. Daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*. (2001), 11, 1975 -1980.
- Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *Lancet*.(1993), 342, 1007-1011.
- Hollman, P.C.; Hertog, M.G. and Katan, M.B. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochemical Society Transactions*. (1996), 24, 785-789.
- Hollman, P.C.; Katan, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedical Pharmacotherapy*. (1997), 51, 305-310.
- Hollman, P.C.; Katan, M.B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. (1999), 37, 279-299.

Hope, I.A. En *C. elegans*. A Practical Approach. Ed Ian A. Hope. School of Biology University of Leeds Oxford (1999).

Hopia, A. and Heinonen, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *Journal of the American Oil Chemists Society*. (1999), 76, 1, 139-144.

Horvitz, H.R. 2004. Genetic control of nematode development and behavior (on line) disponible <http://www.hhmi.org/research/investigators/horvitz.html>. 12/2008.

Host, B. and Williamson G. Nutrientes and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*. (2008), 19: 73-82.

Hu, P.J. Dauer* (August 08, 2007). WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook. 1.144.1, <http://www.wormbook.org>.

Huang, C., Xiong, C. Kornfeld, K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA (2004), 101, 8084-8089.

Huang, Q.; Wu, L.J.; Tashiro, S.; Onodera, S.; Ikejima, T. Elevated levels of DNA repair enzymes and antioxidative enzymes by (+)-catechin in murine microglia cells after oxidative stress. *Journal of Asian Natural Products Research*. (2006), 8, 61-71.

Ishii, N. The role of stress in ageing: research on the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *British Journal of Dermatology*. (2005), 153 (suppl. 2), pp1-5

Iwashina, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*. (2000), 113, 287-299.

Jackman, R. I.; Smith, J. L. Anthocyanins and betalains. En: *Natural Food Colorants*. Hendry G. A. F.; Houghton j. D. (eds), 2nd ed, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall. (1996), 244 – 280.

Jerumanis, J. Quantitative Analysis of Flavonoides in Barley, Hops and Beer by High-performance Liquid-Chromatography (Hplc). *Journal of the Institute of Brewing*. (1985), 91(4), 250-252.

Johnson, T.E. Aging can be genetically dissected into component processes using long-lived lines of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. (1987), 84, 3777–3781.

Johnson, T.E.; de Castro, E.; Hegi de Castro, S.; Cysper, J.; Henderson, S.; Tedesco, P. Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through

gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*. (2001), 36, 1609-1617.

Joseph, J.; Shukitt-Hale, B.; Casadeus, G. Reversing the deleterious effects of ageing on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *American Journal of Clinical Nutrition*. (2005), 81 (suppl.), 313S-316S.

Jovanovic, S.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. (1994), 116, 4846-4851.

Justensen, U.; Knuthsen, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. (1998), 799: 101

Kalella, T., and Hengartner, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery* (2008), 5, 387-399.

Kampkötter, A.; Nkwonkam, C.G.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl R. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*. (2007a), 234, 113-123.

Kampkötter, A.; Nkwonkam, C.G.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl R. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Toxicology*. (2007b), 81: 849-858.

Kampkötter, A.; Pielarski, T.; Rohrig, R.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. The *Ginkgo biloba* Egb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological Research* (2007c), 55, 139-147.

Kampkötter, A.; Timpel, C.; Zurawski, R. F.; Ruhl S.; Chovolou, Y.; Proksch, P.; Wätjen, W. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 149 (2008), 314-323.

Kan, YE; Chen-BO, Ji; Xiao-Wei, LU; Yu-Hui, N.I.; Chun-Lin, GAO; Xiao-Hui, CHEN; Ya-Ping, ZHAO; Gui-Xiong, GU. and Xi-Rong, GUO. Resveratrol Attenuates Radiation Damage in *Caenorhabditis elegans* by preventing Oxidative Stress. *Journal of Radiation Research* (2010), 51, 473-479.

Kawasaki, I.; Jeong, M.; Oh, B.; Shim, Y. Apigenin inhibits larval growth of *Caenorhabditis elegans* through Daf-16 activation. *FEBS Letters* (2010). 584, 3587-3591.

- Kashiwada, Y.; Nonaka, G.I.; Nishioka, I.; Ballas, I.M.; Jiang, J.B.; Janzen, W.P, Lee, K.. Tannins as selective inhibitors of protein-kinase-c. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (1992), 2, 3, 239-244.
- Kemphues, K. Essential Genes (December 24, 2005) WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook. 1.57.1, <http://www.wormbook.org>.
- Kenyon, C.; Chang, J.; Gensch, E.; Rudner, A.; Tabtiang, R. A C. elegans mutant that lives twice as long as wild-type. *Nature*. (1993), 366, 6454, 461-464.
- Kenyon, C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell*. (2005), 120, 449-460.
- Kimura, K.D.; Tissenbaum, H.A ; Liu, Y. ; Ruvkun, G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (1997), 277, 942-946.
- Kirwood, T.B. Evolution of ageing. *Nature* (1987), 270, 301-304.
- Klass, M.R. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: ,ajor biological and environmental factors influencing life span. *Mechanisms Ageing Development*. (1977), 6, 413-429.
- Klass, M.R. in Longevity and ageing in parasitic and free-living nematodes. David Gems. *Biogerontology*. (2000), 1, 289-307.
- Knekt, P.; Reunanen, A.; Jarvinen, R.; Maatela, J. Flavonoid intake and coronary mortality – Reply. *British Medical Journal*. (1996), 312, 7044, 1480-1480.
- Kofink, M. Papagiannopoulos M, Galensa R; (-)-Catechin in cocoa and chocolate: Occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. *Molecules*. (2007), 12, 7, 1274-1288.
- Kühnl, J.; Bobik, T.; Procter, J.B.; Burmeister, C.; Höppner, J.; Wilde, I.; Lüersen, K.; Torda, A.E.; Walter, R.D. and Liebau, E. Functional analysis of methylmalonyl-CoA epimerase from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS J*. (2005), 272, 1465–1477.
- Kühnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Review of Nutrition and Dietetics*.(1976), 24, 117-191.
- Kuskoski, E.M.; Activity Antioxidant of antocyanin pigment. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. (2004), 24, 4, 691-693.
- Kyler, J. and Duthie, G. Flavonoids in Food in Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Eds. Oyvind M. Andersen and kenneth R. Markham (2006).

- Lakowski, B.; Hekimi, S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. (1998), 95, 13091-13096.
- Larrauri, J.A. Obtención de nuevos tipos de fibras alimentarias a partir de subproductos de frutas tropicales. Propiedades y aplicaciones en nuevos productos dietéticos. Tesis doctoral. Universidad politécnica. Madrid, España (1997).
- Lea, A. G. H. Flavour, color and stability in fruit products: the effect of polyphenols. En *Plant polyphenols*. Ed by Hemingway RW and Laks PE. Plenum Press, New York USA (1992), 827-837.
- Le bars, P.L.; Kieser, M.; and Ltil, K.Z. A 26 weeks analysis of a double-blind, placebo-controlled trial of the *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. (2000), 11, 230-237.
- Lee, S.S.; Kennedy, S.; Tolonen, A.C.; Ruvkun, G. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* (2003), 300, 644-647.
- Lee, D.H.; Szczepanski, M.; Lee, Y.J.; Role of Bax in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochemical Pharmacology*.(2008), 75, 2345-2355.
- Lee, S.; Murphy, C and Kenyon, C. Glucose Shortens the Life Span of *C. elegans* by Downregulating DAF-16/FOXO activity abd Aquaporin Gene Expression. *Cell Metabolism*. (2009), 10, 379-391.
- Lee, Y.k.; Hwang, J.T.; Kwon, D.K.; Surh, Y.J.; Park, O.J. Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK α 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Letters*. (2010), 292, 228-236.
- Lemanska, K.; Van der Woude, H.; Szymusiak, H.; Boersma, M.B.; Gliszczynska-Swiglo, A.; Rietjens, I.M.; Tyrakowska, B. *Free Radical Research* (2004), 38, 639-647.
- Leroux, M.R.; Melki, R.; Gordon, B.; Batelier, G.; Candido, E.P. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *Journal of Biological Chemistry*. (1997), 272, 24646-24656.
- Levites, Y.; Amit, T.; Youdim, M.B.H.; Mandel, S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *Journal of Biological Chemistry*. (2002), 277, 34, 30574-30580.
- Lewis, J.A.; Fleming, J.T. Basic culture methods in Methods. In *Cell Biology*. Eds. Henry Epstein and Diane Shakes. Academic Press (1995), p. 4.

- Li, C.; Lee, M-J. Sheng, S. Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chemical Research in Toxicology*. (2000), 13, 177-184.
- Lin, K.; Hsin, H.; libina, N. And Kenyon, C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signalling. *Nature Genetics* (2001), 28, 139-145.
- Lin, K.; Dorman, J.B.; Rodan, A. and Kenyon, C. Daf-16: an HNF-3/forhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* (1997), 278, 1319-1322.
- Link, C.D.; Taft, A.; Kapulkin, V.; Duke, K.; Kim, S.; Fei, Q.; Wood, D.E. Sahagan, B.G. Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging* (2003), 24, 397-413.
- Lithgow, G.J.; White, T.M.; Melov, S.; Johnson, T.E. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. (1995), 92, 7540-7544.
- Loke, W.M.; Hodgson, J.M.; Proudfoot, J.M.; Puddey, I.B.; Croft, K.D.; McKinley, A.J. Dietary flavonoids and circulating concentrations of nitrate, nitrite, and S-nitrosothiols Reply to JO Lundberg. *American Journal of Clinical Nutrition* (2009), 89, 2, 652-653.
- Lozano, E.; Saez, A.G.; Flemming, A.J.; Cunha, A.; Leroi, A.M., Regulation of growth by ploidy in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*. (2006), 16(5): 493-498.
- Lund, J.; Tedesco, P.; Duke, K.; Wang, J.; kim, S.; Johnson, T. Transcriptional profile of aging in *C. elegans*. *Current Biology*. (2002), 12, 1566-1573.
- Mains, P.E. and McGhee, J.D. Biochemistry of *C. elegans*. In *C. elegans - a practical approach*, I.A. Hope, ed. (Oxford, UK: Oxford University Press), (1999), pp. 227-244.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémesy, C.; Jimenéz, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. (2004), 79, 727-747.
- Manach, C.; Donovan, J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*. (2004), 38, 8, 771-785.
- Markham, K. R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press (1982), 1, 36-39.
- Marshall, P.J.; Warso, M.A.; and Lands, W.E.M. Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. *Analytical Biochemistry*. (1985), 145, 192-199.
- Martinez-Duncker, I.; Mollicone, R.; Codogno, P. and Oriol, R. The nucleotide sugar transporter family: a phylogenetic approach. *Biochimie*. (2003), 85, 245-260.

Martorell, Patricia; Josep Vicent Forment; Rosa de Llanos; Fernando Montón; Silvia Llopis; Nuria Gonzáles; Salvador Genovés, Elena Cienfuegos, Honorato Monzó y Daniel Ramón. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols as an antioxidant food ingredient. Submitted to *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010).

Mathews, C.K. and Van Holde, K.E. Biochemistry, second edition (Menlo Park, Ca: The Benjamin/Cummings publishing company (1996).

Mckay, S.J.; Johnsen, R., Khattra, J. Gene expression profiling of cells, tissues, and developmental stages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor symposium on Quantitative Biology*. (2004), 68, 159-169.

Medveded, Z. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biological Reviews*. (1990), 65: 375-98.

Menendez C, Dueñas M, Galindo P, González-Manzano S, Jimenez R, Moreno L, Zarzuelo MJ, Rodríguez-Gómez I, Duarte J, Santos-Buelga C, Perez-Vizcaino F Vascular deconjugation of quercetin glucuronide. The flavonoid paradox revealed? *Molecular Nutrition and Food Research* (aceptado para publicación).

Metodieva, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickancaite, E. and Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine*.(1999), 26, 107-116.

Middleton, E.; and Kandaswami, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids: Advance in research since 1986*.(Eds.) Haborne, J. B. (1993), p. 619-620.

Middleton, E.Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* (2000), 52, 673-751.

Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A., The relative contribution of ascorbic and phenolic antioxidants to the total antioxidants activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*. (1997), 60, 331-337.

Miller, N.J.; Castellucio, C.; Tijburg, L.; Rice-Evans, C. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators? *FEBS Letters*.(1996), 392, 40-44.

Min, K and Ebeler, S. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*. (2008), 46, 96-104.

Mohri-Shiomi, Akiko; Garsin, Danielli, A. Insulin signaling and the heat shock response modulate protein homeostasis in the *Caenorhabditis elegans* intestine during infection. *Journal of Biological Chemistry*. (2008), 283, 1, 194-201.

Moon, J.H.; Tsushida, T.; Nakahara, K., Terao, J. Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radical Biology and Medicine*. (2001), 30, 1274-1285.

Morand, C.; Manach, C.; Crespy, V.; Remesy, C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research* (2000), 33, 5, 667.

Mörck, C. Pilon, M. C. *elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC. Developmental Biology* (2006), 6:39.

Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Seegent, O.; Padeloup, N; Brissot, P.; Cillard, P; Cillard, J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechins, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology*. (1993), 45, 13-19.

Moskaug, J.O.; Carlsen, H.; Myhrstad, M.; Blomhoff, R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2004), 125, 315-324.

Mukhopadhyay, A.; Oh S. W.; Tissenbaum, H. A. Worming pathways to and from DAF-16/FOXO *Experimental Gerontology* (2006), 41, 10, 928-934.

Mullen, W.; Graf, B.A.; Caldwell, S.T.; Hartley, R.C.; Duthie, G.G.; Edwards, C.A.; Lean, M.E.; Crozier, A. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (2002), 50, 6902-6909.

Muller, F.L.; Lustgarten, M.S.; Jang, Y.; Richardson, A.; Van Remmen, H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*. (2007), 43, 477-503.

Muñoz, M.J. Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* (2003), 124, 43-48.

Murakami, A.; Koshimizu, K.; Kuwahara, S.; Takahashi, Y.; Ito, C.; Furukawa, H.; Ju-Ichi, M. and Ohigshi, H. *In vitro* absorption and metabolism of nobiletin, a chemopreventive

polymethoxyflavonoid in citrus fruits. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. (2001), 65, 194-197.

Murota, K.; Terao, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2003), 417, 1, 12-17.

Murphy, C.T.; McCarroll, S.A.; Bargmann, C.I.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. (2003), 424, 277-283.

Mushegian, A.R.; Garey, J.R.; Martin, J.; Liu, L.X. *C. elegans*. Genome Research. (1998), 6, 590-98.

Natsume, M.; Osakabe, N.; Oyama, M.; Sasaki, M.; Baba, S.; Nakamura, Y.; Osawa, T.; Terao, J. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: Differences between human and rat. *Free Radical Biology and Medicine*. (2003), 34, 7, 840-849.

Nemeth, K.; Plumb, G.W.; Berrin, J.G.; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H.Y.; Williamson, G.; Swallow, D.M.; Kroon, P.A.; Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition* (2003), 42, 1, 29-42.

Nielsen, I.L.; Dragsted, L.O.; Ravn-Haren, G.; Freese, R.; Rasmussen, S.E. Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2003), 51, 2813-2820.

Niki, E. α -Tocopherol. En "Handbook of antioxidants". (L. Packer and E. Cadenas. Eds.) Marcel Dekker, New York. (1996), pp 3-25.

Noguchi, N.; Komuro, E.; Niki, E.; Willson, R.L. Action of curcumin as an antioxidant against lipid peroxidation. *Journal of the Japanese Oil Chemistry Society*. (1994), 43, 1045-1051.

Noroozi, M.; Angerson, W.J.; Lean, M.E. Effects of flavonoids and vitamin c on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*. (1998), 67, 1210-1218.

Oh, S.W.; Mukhopadhyay, A.; Dixit, B.L.; Raha, T.; Green, M.R.; Tissenbaum, H.A. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nature Genetics*. (2006), 38, 251-257.

Ogg, S.; Paradis, S.; Gottlieb, S.; Patterson, G.I.; Lee, L.; Tissenbaum, H.A.; Ruvkun, G. The forkhead transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*. (1997), 389, 994-999.

Paganga, G.; Al-Hashim, H.; Khodr, H.; Scout, B.C.; Auroma, O.I.; Hider, R.C.; Halliwell, B.; Rice-Evans, C. Mechanisms of the antioxidants activities of quercetin and catechins. *Redox Report*. (1996), 2, 356-364.

Partridge, L.; Gems, D. Mechanisms of ageing: public or private? *Nature Reviews Genetics*. (2002), 3, 165-175.

Parsell, D.A. and Lindquist, S. Heat shock proteins and stress tolerance. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (eds R.I. Morimoto, A. Tissières & C. Georgopoulos), (1994), 457-494. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Parsons Peter A. Antagonistic pleiotropy and the stress theory of aging. *Biogerontology* (2007), 8: 613-617.

Pearson, D.A.; Schmitz, H.H.; Lazarus, S.A.; Keen, CL Inhibition of in vitro low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas *Flavonoids and other Polyphenols Book series: Methods in Enzymology*. (2001), 335, 350-360.

Pietsch, K.; Saul, N.; Menzel, R., Stürzenbaum, S.R.; Steinberg Christian C.E.W. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology*. (2009), 10, 565-578.

Piskula, M.K., Yamakoshi, J., Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Letters*. (1999), 447: 187-291.

Plumb, G.W.; de Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Cheynier, V.; Williamson, G. Antioxidants properties of catechins and proanthocyanidins: Effects of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research*. (1998), 29, 351-358.

Prasain, J.K.; Carlson, S.H.; Wyss, J.M. Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical Windows. *Maturitas* (2010), 66, 163-171.

Prasain, J.K. and Barnes S. Metabolism and Bioavailability of Flavonoids in Chemoprevention: Current analytical Strategies and Future Prospectus. *Molecular Pharmaceutics* (2007), 4, 6, 846-864.

Price, K.R.; Colquhoun, I.J.; Barnes, K.A.; Rhodes, M.J.C. Composition and content of flavonol glycosides in green beans and their fate during processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1998), 46, 12, 4898-4903.

- Quevedo, C.; Kaplan, D.R.; Derry, W.B. AKT-1 regulates DNA-damage-induced germline apoptosis in *C. elegans*. *Current Biology*. (2007), 17, 286-292.
- Ramírez-Tortosa, C.; Andersen, O.M.; Gardner, P.T.; Morrice, P.C.; Wood, S.G.; Duthe, S.J.; Collins, A.R.; Duthie, G.G. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine*. (2001), 33, 9, 1033-1037.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.S.; Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. (1999), 26, 1231-1237.
- Reinhart, B.J.; Ruvkun, G. Isoform specific mutations in the *Caenorhabditis elegans* heterochromic gene *lin-14* affect stage-specific patterning. *Genetics*. (2001), 157, 1, 199-209.
- Rice-Evans, C.A; Miller, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology* (1994), 234, 279-293.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J. and Paganga, G. Structure antioxidant activity relationship of flavonoides and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. (1996), 20, 933-956.
- Rice-Evans, C. Flavonoids in Health and Disease (ed.) Catherine A. Rice-. Evans and Lester Packer, Marcel Dekker Inc. NY, (1998), 405-419,
- Riddle, D.L.; Swanson, M.M. and Albert, P.S. Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature*. (1981), 290, 668-671.
- Rios, L.Y.; Gonthier, M.P.; Remesy, C. Chocolate intake increase urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. (2003), 77, 912-918.
- Rivas-Gonzalo, J. C. Analysis of Anthocyanins. En: Methods in polyphenol Analysis. Santos-Buelga, C. and Williamson, G. (Eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge (2003), p. 338.
- Saint-Criq de Gaulejac, N.; Provost, C.; Vivas, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1999), 47, 425-431.
- Sánchez-Blanco, A; Stuart K, K. Variable Pathogenicity Determines Individual Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*. (2011), 7, 4, 1-14.

- Santos-Buelga, C; Scalbert, A Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of Science of Food and Agriculture*. (2000), 80: 1094-1117.
- Santos-Buelga, C.; Garcia-Viguera, C.; Tomas-Barberan, F.A. On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. En: *Methods in Polyphenol Analysis*. Santos-Buelga, C. and Williamson, G. (Eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge. (2003), p. 338.
- Sarkis, G.J.; Kurpiewski, M.R.; Ashcom, J.D.; Jenjacobson, L.; Jacobson, L.A. Proteases of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (1988), 261, 1, 80-90.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Steinberg Christian C.E.W. Quercetin- mediated longevity in *C. elegans*: Is DAF-16 involved? *Mechanisms of Ageing and Development*. (2008), 129, 10, 611-613.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R.; Steinberg Christian C.E.W. Catechin induced longevity in *C. elegans*: FROM Key regulator genes to disposable soma. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2009), 130, 447-486.
- Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal on Nutrition*. (2000), 130, 2073S-2085S.
- Scalbert, A.; Johnson, I.T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*. (2005), 81, 215S-217S.
- Schaffitzel, E.; Hertweck, M. Recent aging research in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*. (2006), 41, 557-563.
- Scheline, R.R. Metabolism of oxygen heterocyclic compounds. CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds. (1999), 243-295CRC Press, Inc. Boca Raton. FL.
- Schewe, T.; Kuhn, H.; Sies, H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *Journal of Nutrition*. (2002), 132, 7, 1825-1829.
- Schroeter, H; Spencer, J.P.; Rice-Evans, C.; Williams, R.J. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein- induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochemical Journal*. (2001) 358: 547-557.
- Scott T. Laughlint and Carolyn R. Bertozzi. In vivo Imaging of *Caenorhabditis elegans* Glycans. *ACS Chemical Biology*. (2009), 4 (12), pp 1068-1072.
- Segalat, L. Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. *ACS Chemical Biology*. (2007), 2, 231-236.

- Selma, M.V.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2009), 57, 6485-6501.
- Sherman, T.; Chernova, M.N.; Clark, J.S.; Jiang, L.W.; Alper, S.L.; Nehrke, K. The abts and sulp families of anion transporters from *Caenorhabditis elegans*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. (2005), 289, 2, C341-C351.
- Shih, C.M.; Lin, H.; Liang, Y.C.; Lee, W.S.; Bi, W.F.; Juan, S.H. Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology* (2004), 496, 41-48.
- Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K.; Nakamura, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1992) 40, 945-948.
- Simonetti, P.; Ciappellano, S.; Gardana, C.; Bramati, L.; Pietta, P. Procyanidins from Vitis vinifera seeds: *In vivo* effects on oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002), 50, 21, 6217-6221.
- Sikora, J.; Urinovska, J.; Majer, F.; Poupetova, H.; Hlavata, J.; Kostrouchova, M.; Ledvinova, J.; Hrebicek, M. Bioinformatic and biochemical studies point to AAGR-1 as the ortholog of human acid alpha-glucosidase in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. (2010), 341, 1-2, 51-63.
- Smith J.V.; Luo, Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Journal of Alzheimers Disease*. (2003), 5, 287-300.
- Sohal, R.S.; Allen, R.G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Experimental Gerontology* (1990), 25: 499-522.
- Spencer, J.P.E.; Schroeter, H; Kuhnle, G.; Srai, S.K.; Tyrrell, R.M.; Hahn, U.; Rice-Evans, C. Epicatechin and its *in vivo* metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochemical Journal*. (2001), 354: 493-500.
- Spieth, J. and Lawson, D. Overview of gene structure (January 18, 2006), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook. 1.65.1, <http://www.wormbook.org>.
- Steffen, Y.; Gruber, C.; Schewer, T.; Sies, H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (2008), 469, 209-219.

- Steenken, S.; Neta, P. One-electron redox potentials of phenols, hydroxyphenols and aminophenols and related compounds of biological interest. *The Journal of Physical Chemistry*. (1982), 86, 3661-3667.
- Strack, M. Problems with Herbal Treatments. *New Zealand Medical Journal*. (1994), 107, 515-515.
- Strayer, A.; Wu, Z.; Christen, Y.; Link, C.D.; Luo, Y. Expression of the small heat shock protein HSP-16.2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGB 761. *The FASEB Journal*. (2003), 17, 2305-2307.
- Sulston, J.E.; Schiernberg, E.; White, J.G.; Thomson, J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* (1983), 100: 64-119.
- Sulston, J. The Sanger Centre, Retrieved 12/10/2004, From <http://www.sanger.ac.uk/User/jes/> (octubre 2009).
- Sunawaga, T.; Shimizu, T.; Kanda, T.; Tagashira, M.; Sami, M.; Shirasawa, T. Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.) Extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Medica*. (2011), 77: 122-127.
- Tang, Soon Yew, Halliwell, Barry. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Communications* (2010), 394, 1-5.
- Taubert, D.; Berkels, R.; Roesen, R.; Klaus, W. Chocolate and Blood Pressure in Elderly Individuals with Isolated Systolic Hypertension. *JAMA*. (2003), 290, 1029-1030.
- Terao, J.; Murota, K.; Kawai, Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone *in vivo*. *Food and Function*. (2011), 2, 11-17.
- Terman, A.; Brunk, U.T. Lipofuscin: mechanism of formation and increase with age. *APMIS*. (1998), 106, 265-276.
- The C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* (1998), 282, 2012-2018.
- Tissenbaum, H.A.; Ruvkun, G.; An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* (1998), 148, 703-717.
- Tsai, P.J.; McIntosh, J.; Pearce, P.; Camden, B.; Jordan, B.R. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*. (2002), 35, 351-356.
- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radical, metal and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biology Interaction*. (2006), 160, 1-40.

Van Raamsdonk, J.M. and Hekimi, S. Recative Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Causal Relationship? *Antioxidants & Redox Signaling*. (2010) DOI: 10.1089/ars.2010.3215.

Van Voorhies, W.A.; and Ward, S, Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.(1999), 96, 20, 11399-11403.

Vastrik, I.; D'Eustachio, P.; Schmidt, E.; Joshi-Tope, G.; Gopinath, G.; Croft, D.; de Bono, B.; Gillespie, M.; Jassal, B.; Lewis, S. Reactome: a knowledge base of biologic pathways and processes. *Genome Biology*. (2007), 8, R39.

Ventura, N.; Rea, S.; Henderson, S.T.; Condo, I.; Johnson, T.E.; Testi, R. Reduced expression of tritaxin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. (2005), 4(2): 109-112.

Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V. ; Waters, E. J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of science of Food and Agriculture*. (2003), 83(6), 564-573.

Viswanathan, M.S.; kim, S.K.; Berdichevsky, A.; Guarente, L. A role for SIR-2.1 regulation of stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Developmental Cell*. (2005), 9, 605-615.

Wade, C.R.; Van Rij, A.M. In vitro lipid peroxidation in Man as measured by the respiratory excretion of ethane, pentane and other low-molecular-weight hydrocarbons. *Analytical Biochemistry*. (1985), 150-151.

Wallace, D.C.; Melov, S. Radicals'aging . *Nature Genetics*. (1998), 19, 105-106.

Wang, H.; Cao, G. and Prior, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1996), 44, 701-705.

Wang, H.; Cao, G.; and Prior, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1997), 45, 304-309.gle

Wang, X.; Wang, X.; Li, L.; Wang, D. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by DMSO is dependnt on *sir-2.1* and *daf-16*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2010), 400, 613-618.

Waterhouse, A.L.; Shirley, J.R.; Donovan, J.L. Antioxidants in chocolate. *Lancet* (1996), 348, 9030, 834-834.

- Weinges, P.J.; Cameira-dos-Santos, K.; Göritz, K.; Nader, F. Konfigurationsdestimmung von C₃₀H₂₆O₁₂ procyanidinen und strukturaufklärung neuen procyanidins. *Liebigs Annalen der Chemie* (1986), 715, 164-171.
- Wilson, M.A.; Shukitt-Hale, B.; Kalt, W.; Ingram, D.K., Joseph, J.A.; Wolkow, C.A. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. (2006), 5, 59-68.
- Williams, R.J.; Spencer, J.P.; Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*. (2004), 36, 838-849.
- Williamson, G.; Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* (2005), 81, 243S-255S.
- Witting, P.K.; Mauk, A.G.; Douglas, D.J.; Stocker, R. Reaction of human myoglobin and peroxynitrite: Characterizing biomarkers for myoglobin-derived oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2001), 286, 2, 352-356.
- Wolffram, S. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine - Reply. *Journal of Nutrition*. (2002), 132, 9, 2428-2428.
- Wolkow, C.A. Insulin-like signalling in neurons controls lifespan in *C-elegans*. *Journal of Neurochemistry*. (2002), 81, 1, 37-37.
- Wollenweber, E. Flavones and flavonols En: *The Flavonoids: Advance in research since 1986*. (Eds.) Haborne, J. B. (1993), p. 259.
- Wood, W.B. (Ed.). *The nematode Caenorhabditis elegans*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1988).
- Wu, Z.; Smith, J.V.; Paramasivam, V.; Butko, P.; Khan, I.; Cypser, J.R.; Luo, Y. Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell and Molecular Biology*. (2002), 48, 725-731.
- Xue, Y-L.; Ahiko, T.; Miyakawa, T.; Amino, H.; Hu, F.; Furihata, K.; Kita, K.; Shirasawa, T., Sawano, Y.; Tanokura, M. Isolation and *Caenorhabditis elegans* lifespan assay of flavonoids from onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2011), 59, 5927-5934.
- Yen, G.C. and Chen, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1995), 43, 27-32.
- Yochum, L.; Kushi, L.H.; Meyer, K. and Folsom, A.R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease. *American Journal Epidemiology*. (1999) 149, 943-949.

Yoshida, T.; Mori, K.; Hatano, T.; Okumura, T., Uehara, I.; Komagoe, K.; Fujita, Y., Okuda, T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. (1989), 37, 1919-1921.

Zhang, L.; Jie, G.; Zhang, J., Zhao, B. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radical Biology and Medicine*. (2009), 46, 414-421.

www.cbs.umn.edu/CGC

www.hhmi.org/research/investigators/horvitz.html (10/2009).

www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/08/2010.

www.phenol-explorer.eu

www.wormclassroom.org

www.wormatlas.org/.../Introframeset.htm.

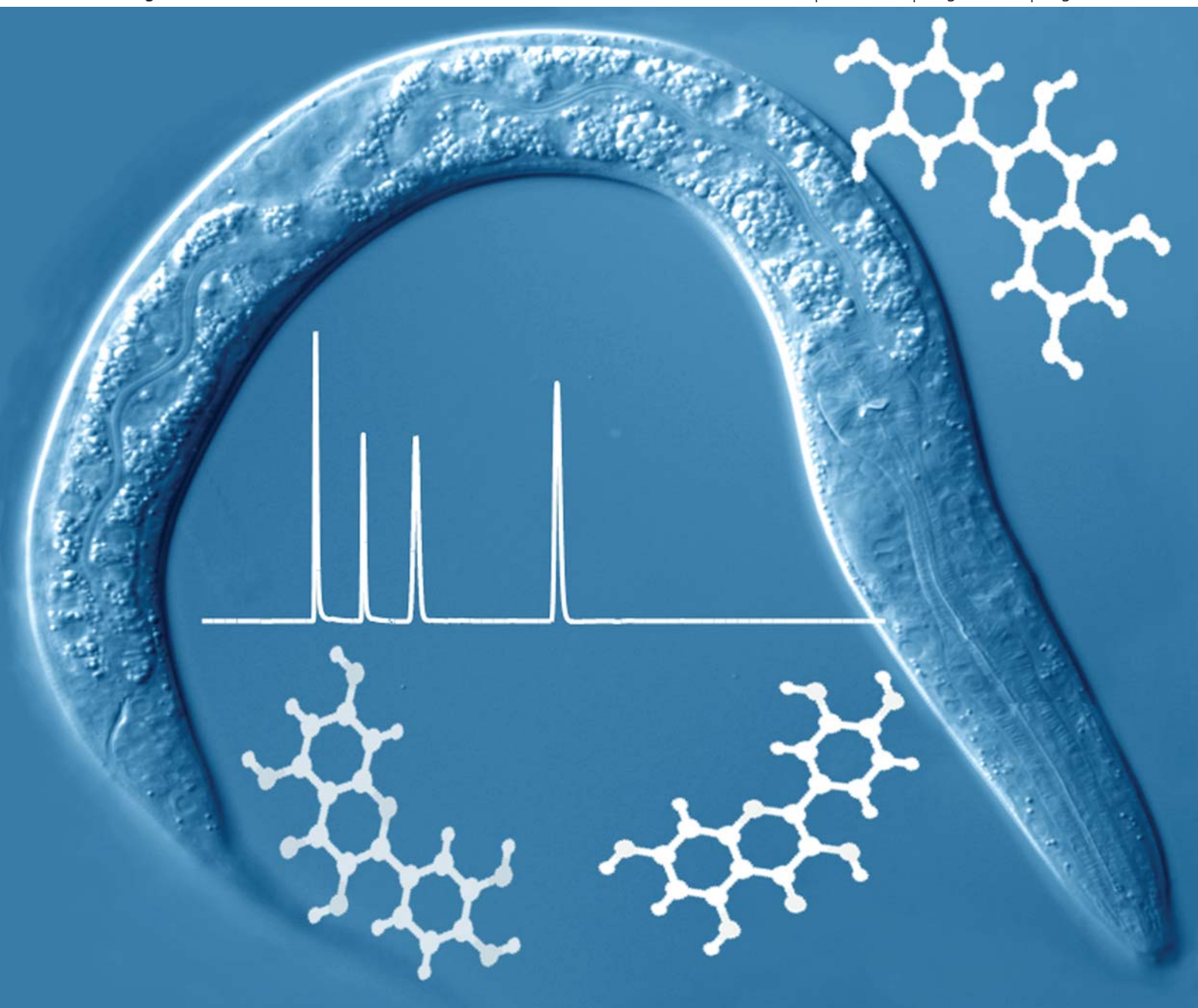
www.sageke.sciencemag.org

Food & Function

Linking the chemistry and physics of food with health and nutrition

www.rsc.org/foodfunction

Volume 2 | Number 8 | August 2011 | Pages 431–506



ISSN 2042-6496

RSC Publishing

COVER ARTICLE

Santos-Buelga *et al.*
Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress,
thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*



2042-6496 (2011) 2:8;1-4

Cite this: *Food Funct.*, 2011, **2**, 445www.rsc.org/foodfunction

PAPER

Effects of *O*-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*†

Felipe Surco-Laos,^a Juan Cabello,^b Eva Gómez-Orte,^b Susana González-Manzano,^a Ana M. González-Paramás,^a Celestino Santos-Buelga^{*a} and Montserrat Dueñas^a

Received 24th March 2011, Accepted 23rd June 2011

DOI: 10.1039/c1fo10049a

Quercetin is a major flavonoid in the human diet and the most commonly used in studies of biological activity. Most of the knowledge about its biological effects has originated from *in vitro* studies while *in vivo* data are scarce. Quercetin mostly occurs in foodstuffs as glycosides that are deglycosylated during absorption and further submitted to different conjugation reactions. Methylation to isorhamnetin (quercetin 3'-*O*-methylether) or tamarixetin (quercetin 4'-*O*-methylether) seems to be an important conjugation process in quercetin metabolism. In this work, the effects of quercetin and its 3'- and 4'-*O*-methylated metabolites on the phenotypic characteristics, stress oxidative resistance, thermotolerance and lifespan of the model organism *Caenorhabditis elegans* have been assessed. The three assayed flavonols significantly prolonged the lifespan of this nematode with an increase from 11% to 16% in the mean lifespan with respect to controls. However, only quercetin significantly increased the reproductive capacity of the worm and enlarged the body size. Exposure to the assayed flavonols also increased significantly the resistance against thermal and juglone-induced oxidative stress, although differences were found depending on the stage of development of the worm. Thus, quercetin offered greater protection when thermal stress was applied in the 1st day of adulthood, whereas tamarixetin was more efficient in worms submitted to stress in the 6th day of adulthood. Similarly, significantly greater protection was provided by quercetin than by its methylated derivatives at the 1st day of adulthood, whilst quercetin and isorhamnetin were equally efficient when the oxidative stress was induced in the 6th of day of adulthood. Further evidence of antioxidant protection was obtained checking the oxidation status of proteins by the OxyBlot™ detection kit. Analyses by HPLC-DAD-ESI/MS confirmed that the three flavonols were taken up by *C. elegans* leading to the formation of some glycosylated, sulfated and methylated metabolites, and that demethylation of these latter to quercetin was also produced. Quantification of the levels of quercetin, isorhamnetin and tamarixetin, as well as their detected metabolites indicated a greater uptake of quercetin than its methylated derivatives by the nematode.

1. Introduction

A large number of epidemiological studies have demonstrated that the intake of dietary flavonoids is inversely associated with the risk of coronary heart disease, cancer and immuno disfunctions.^{1–4} Quercetin is the main flavonol in the human diet and the most commonly used in studies of biological activity. Much attention has been paid to its antioxidant and free radical scavenging properties⁵ and biological activities, such as

antithrombotic and anti-carcinogenic activities.⁶ Also quercetin is an effective inhibitor of xanthine oxidase and lipoxygenase, enzymes involved in processes such as inflammation, atherosclerosis, cancer and ageing.^{7,8} Most of the knowledge about quercetin has originated from *in vitro* studies while *in vivo* data that take into consideration the complex interplay of diverse processes like uptake, metabolism and organ and tissue interactions within a whole animal are more limited.⁹ In order to overcome this limitation and to gain additional knowledge about the effects of flavonoids in an *in vivo* model, some studies have been carried out with the nematode *Caenorhabditis elegans*, especially with respect to stress resistance and ageing.^{10–19} Beside others, the reasons for using *C. elegans* as an *in vivo* model are the ease of handling, its well-defined cell lineages and development stages that make it an attractive model animal to identify physiological roles of chemicals, and the fact of having its complete genome sequence and the

^aGrupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. E-mail: csb@usal.es; Fax: +00 34 923294515; Tel: +00 34 923294537

^bCenter for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c1fo10049a

vast genetic information about it.²⁰ Furthermore, the multicellularity of this organism with the presence of tissue and organ systems raises the possibility to consider the metabolism of compounds. The worms exhibit many behavioural phenotypes including egg laying, locomotion, chemotaxis, stress response *etc.*, which are well employed in developmental biology, genetics and neurobiology studies.¹² In past decades, many key discoveries with relevance for mammals have been made in *C. elegans*. This was possible because there is a strong correlation between *C. elegans* and mammals in cellular and molecular principles and for 60–80% of the human genes homologues have been identified in *C. elegans*.^{20,21}

Studies with blueberry and *Ginkgo biloba* extracts rich in polyphenols have provided evidences that *C. elegans* responds upon exposure to these extracts with increased stress oxidative and thermal resistance and even extended lifespan in wild type worms.^{10,11,13,22,23} It has been observed that thermal stress increased reactive oxygen species (ROS) accumulation in worms in a time dependent manner, which suggests that an important component of the toxicity of heat could be the elevated generation of ROS.¹⁴ Flavonols such as quercetin, kaempferol, fisetin and rutin reduced the intracellular ROS accumulation at thermal stress.^{14,15} Quercetin shows higher antioxidant activity than other flavonols, which may explain its greater protective effects against lethal thermal stress and the reduction in accumulation of the ageing marker lipofuscin,^{14,16} a pigment resulting from oxidative degeneration of cellular components and also correlated with the process of ageing in *C. elegans*.^{24,25} Other results suggested that in addition to these beneficial effects, quercetin influences the expression of the phase II metabolism enzyme glutathione *S*-transferase GST-4, a marker for intracellular oxidative stress, and also affects cellular signalling.¹⁴ Various studies have shown that the protective and life prolonging action of quercetin in *C. elegans* was not only due to its strong antioxidant capacity but it may also be mediated by modulation of the FoxO transcription factor DAF-16, which could have a crucial function in several signalling cascades controlling the stress response, the process of ageing and other important biological functions in *C. elegans*.^{15–18}

The uptake of compounds is an essential prerequisite for the ability to cause systemic effects. However, few studies exist about the metabolism and bioavailability of flavonoids by *C. elegans*. As far as we know, the only study available concerning quercetin was carried out in liquid medium by Kampkötter *et al.*,¹⁶ who observed that quercetin was taken up by *C. elegans* although no possible metabolites generated by the worm were detected.

Flavonols like quercetin mostly occur in foodstuffs as glycosides and, in general, in humans the first step in their metabolism is likely to be deglycosylation before absorption in the small intestine.^{26,27} During transfer across the enterocyte, and, subsequently, in the liver, quercetin undergoes *O*-methylation and other conjugation reactions, namely glucuronidation and sulfation by phase II enzymes. Although it has never been shown, some of these reactions might also take place in *C. elegans*, once the major pathways of intermediary metabolism found in heterotrophic organisms are also present in *C. elegans*,²⁸ and databases such as Wormbase, Reactome and KEGC show that *C. elegans* possesses orthologs for most of the enzymes involved in the main pathways of intermediary metabolism. Even though

the nematode has no distinct adipose tissue or liver, some of their functions might be expressed in other tissues such as the intestine.²⁹ For instance, glycosyltransferases, which function in carbohydrate metabolism, appear to be expressed in the digestive tract of the worm.^{30,31}

Methylation to isorhamnetin (quercetin 3'-*O*-methylether) or tamarixetin (quercetin 4'-*O*-methylether) seems to be an important step in quercetin metabolism. Conjugated metabolites are likely to possess different biological properties than parent compounds do. A decrease in the *in vitro* antioxidant activity of quercetin following methylation of the hydroxyl groups was found in different studies.^{32–34} However, to our knowledge, no studies exist concerning the effect of methylated metabolites of quercetin on *C. elegans*.

In the present work, the effects of quercetin and its 3'- and 4'-*O*-methylethers (Fig. 1) on the phenotypic characteristics, stress oxidative resistance, thermotolerance and lifespan of *C. elegans* have been assessed. Furthermore, the uptake of the assayed compounds by the worm was confirmed and some metabolites of their biotransformation identified by HPLC-DAD-ESI/MS.

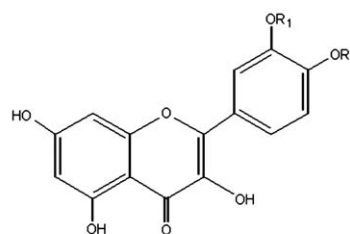
2. Experimental

2.1. Standards and reagents

Quercetin was purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Ampicillin sodium salt, nistatine, agar, yeast extract, juglone and cholesterol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Isorhamnetin, tamarixetin were purchased from Extrasynthèse (Genay, France). HPLC-grade methanol, acetonitrile, dimethyl sulfoxide (DMSO), calcium chloride and magnesium sulfate were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), CarloErba (Rodano, Italy), and Scharlau Chemie (Barcelona, Spain), respectively. Peptone from soybean and tryptone medium were purchased from Fluka (Switzerland).

2.2. Strains and maintenance conditions

C. elegans strains wild type N2 were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Centre at the University Minnesota



Compounds	R ₁	R ₂
Quercetin	H	H
3'- <i>O</i> -methyl quercetin (Isorhamnetin)	CH ₃	H
4'- <i>O</i> -methyl quercetin (Tamarixetin)	H	CH ₃

Fig. 1 Structures of quercetin, isorhamnetin and tamarixetin.

(Minneapolis, USA). All strains were routinely propagated at 20 °C on nematode growth medium (NGM) plates with *Escherichia coli* strain OP50 as a food source.³⁵ Some assays were also performed using heat killed bacteria (30 min at 65 °C).³⁶

Synchronisation of worm cultures was achieved by treating gravid hermaphrodites with bleach (12% sodium hypochlorite). The eggs were incubated in buffer M9 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 mL 1M MgSO₄, H₂O to 1 L) for one day up to the embryos hatched at the L1 stage, and were then transferred to NGM plates. For the assays in the presence of the different assayed flavonols, stock solutions (200 mM) of each compound were prepared in DMSO and incorporated into the culture medium to a final concentration of 200 µM. Since the studied flavonols tended to partially precipitate during the preparation of the plates, these were placed on an ice bath so quick solidification of the agar was produced, which avoided compound separation. NGM plates containing DMSO at the same final concentration as the one used in the assays with flavonols (*i.e.*, 0.2% DMSO, v/v) were also prepared and used as control assays.

2.3. Lifespan assay

Age synchronized young larvae (L1) were transferred to NGM agar plates (Ø 96 mm) containing quercetin, isorhamnetin or tamarixetin (200 µM) and grown at 20 °C, the optimal culture temperature for *C. elegans*. Once the worms reached the last larval stage (L4) they were transferred with a platinum wire to new treatment plates (Ø 35 mm). This moment was considered as the first time point for the counting of surviving worms. Fifteen animals were transferred per plate. Assays for each compound were performed in at least 100 nematodes. For six consecutive days until the cessation of egg laying the worms were transferred daily to avoid overlapping generations; further the worms were transferred every two days. Worms were scored as dead if they did not respond to touch stimulus with the platinum wire. Three independent assays were carried out with each flavonol.

2.4. Body length measurement

Synchronized young larvae (L1) were transferred to treatment plates and grown at 20 °C for 6 days to adulthood. Nematode length was determined from about 10 individuals per trial by means of a microscope (Leica M205 FA, Germany) equipped with a camera (Leica DFC 420), coupled to an Leica Application Suite V3 data processing software, after killing by heat treatment at 45 °C for 2 h. Each assay was performed at least three times.

2.5. Reproduction assays

L4 larvae pre-treated in flavonol containing plates (10 per treatment) were transferred individually to treatment and control plates and moved to each day until reproduction ceased. The offspring of each animal was counted at the L2 or L3 stage to verify that eggs were fertile. Assays for each compound were performed three times.

2.6. Assessment of resistance to oxidative stress

Immediately after the bleaching procedure, N2 eggs were incubated in buffer M9 until the hatching of the eggs (L1 stage). L1 larvae were transferred to NGM agar plates containing the different flavonols at a concentration of 200 µM and cultivated to adulthood. Afterwards, adult worms were transferred to NGM agar plates containing 150 µM juglone, a redox cyclizer that generates an intracellular oxidative stress,³⁷ and cultivated for 24 h at 20 °C. In order to evaluate if the stage of development of the worm had an influence in the resistance against oxidative stress, two different assays were performed, in the first one the animals were transferred to the juglone medium the 1st day of adulthood (young adults), and in the second one the 6th day of adulthood. Control assays in plates prepared with only the solvent (0.2% DMSO) without flavonols, were also performed in parallel. The survival of the worms was monitored every 8 h and after 24 h by touch-provoked movement. Worms that reacted to the mechanical stimulus were scored as alive whereas non-responding worms were considered to be dead. All assays were performed three times using about 100 individuals per treatment and controls.

2.7. Assessment of resistance to thermal stress

The survival of the worms at the lethal temperature 35 °C was also evaluated at two stages of development (1st and 6th day of adulthood). L1 nematodes were placed onto treatment and control plates at 20 °C until they reached the first day of adulthood, in which they were switched to 35 °C for 8 h. Besides, a further assay was made with worms that were kept on the flavonol treatments five days more (6th day of adulthood) prior to induce the thermal stress. Afterwards, dead and alive nematodes were counted. Assays were performed with approximately 100 nematodes per treatment.

2.8. Uptake of flavonols by *C. elegans*

After synchronisation, L1 larvae (wild type N2 worms) were incubated for 4–6 days on NGM agar plates supplemented with the different flavonols at a final concentration of 200 µM using either live or dead *E. coli* OP50 as food source for the worms. Plates prepared with 0.2% DMSO were employed as controls. After the incubation, the worms were washed successively once with water, followed by twice with PBST (PBS + 0.01% Tween 20), once with PBS and at lastly with water. The remaining worm pellet was resuspended in methanol and kept at –20 °C for 12 h. Afterwards, samples were homogenised on a Genius 3 vortex for 1 min, and sonicated for 5 min with a Labsonic 1510 (Braun, Germany). Samples were then centrifuged for 10 min at 13,000 g and 4 °C, the supernatant was collected and the process of extraction repeated three times. The methanolic extracts were combined and dried in a centrifugal concentrator micVac (GeneVac, Ipswich, United Kingdom) The residue was dissolved in 100 µL methanol : water (20 : 80, v/v) for HPLC-DAD-ESI/MS analysis.

The remaining worm pellet after the extraction process was also collected and submitted to digestion according to Reinhart and Ruvkun³⁸ so as to determine the protein content by the Bradford method.³⁹

2.9. HPLC-DAD-ESI/MS analyses

Analyses were carried out in a Hewlett-Packard 1100 chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a quaternary pump and a diode array detector (DAD) coupled to an HP Chem Station (rev. A.05.04) data-processing station. An Ascentis™ RP-Amide 3 µm (2.1 × 150 mm) column thermostatted at 30 °C was used. The solvents used were: (A) 0.1% formic acid, and (B) acetonitrile. A elution gradient was established from 15 to 50% B over 15 min, isocratic 50% B for 10 min, from 50 to 75% B over 3 min, isocratic 75% B for 10 min, and re-equilibration of the column, at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. Double online detection was carried out in the DAD using 370 nm as a preferred wavelength and in a mass spectrometer (MS) connected to an HPLC system *via* the DAD cell outlet. MS detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an ESI source and a triple quadrupole-ion trap mass analyzer that was controlled by the Analyst 5.1 software. Zero grade air served as the nebulizer gas (30 psi) and turbo gas for solvent drying (400 °C, 40 psi). Nitrogen served as the curtain (20 psi) and collision gas (medium). The quadrupoles were set at unit resolution. The ion spray voltage was set at -4500 V in the negative mode. Precursor ion analysis was employed to detect all the precursor ions that fragment to a common product ion (*i.e.*, *m/z* 301 corresponding to quercetin). Settings used were: declustering potential (DP) -40 V, entrance potential (EP) -10 V, collision energy (CE) -50 V, and cell exit potential (CXP) -3 V. Enhanced product ion (EPI) mode was further performed in order to obtain the fragmentation pattern of the parent ion(s) of the studied transition in the previous experiment using the following parameters: DP -50 V, EP -6 V, CE -25 V, and collision energy spread (CES) 0 V.

Quantitative analysis of the assayed flavonols and detected metabolites was performed from their chromatographic peaks recorded at 370 nm by comparison with calibration curves obtained by injection of increasing concentrations of quercetin, isorhamnetin and tamarixetin. The results were expressed referred to worm protein as µg of compound/mg protein.

2.10. Quantification of mRNAs by real-time PCR

L1 larvae were transferred to NGM agar plates 8 plates, Ø 96 mm) containing quercetin, isorhamnetin or tamarixetin (200 µM) and grown at 20 °C; worms cultivated in plates without flavonols were used as controls. After 6 days they were collected from plates, washed with water three times, frozen with liquid N₂ and homogenized in a mortar maintained in liquid N₂. Total RNA was isolated from the homogenate using RNA easy kit from Qiagen. Reverse transcription was performed using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) and cDNA was produced by random priming. The RT-PCR primers were as follow: *let-767*, 5'-CGGATA CATCACGCATCAAC, 5'-TCTTTCTGAGAGCAGCAGCA; *act-1*, 5'-CCAGGAATTGCTGATCGTATG, 5'-GGA GAGGGAAGCGAGGATAG; *ama-1*, 5'-CTGACCCAAA GAACACGGTGA, 5'-TCCAATTCGATCCGAAGAAGC; *18s*, 5'-TTCTTCCATGTCCGGGATAG, 5'-CCCCACT CTTCTCGAATCAG; mRNA expression was performed in

triplicate in an Applied Biosystem 7300 real time PCR detection system. The dissociation curve was determined to confirm a unique amplification; *act-1*, *ama-1* and *18s* were taken as the internal controls. The differences of expression were determined by relative quantification method taking *act-1*, *ama-1* and *18s* mRNA as the normalizers.

2.11. OxyBlot analysis

The oxidation status of proteins was determined using the commercial OxyBlot™ protein oxidation detection kit (Millipore, USA). L1 larvae were transferred to NGM agar plates (8 plates, Ø 96 mm) containing quercetin, isorhamnetin or tamarixetin (200 µM) and grown at 20 °C; worms grown in plates without flavonols were used as controls. After 6 days they were collected from plates and washed with water three times. The worm pellet was resuspended in 2 volumes of ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Nonidet P40 and protease inhibitor cocktail), and the mixture was homogenized on a vortex during 30 min to allow cuticle breakdown. Lysates were centrifuged at 10,000 *g* for 30 min and the supernatant collected for protein analysis. Protein concentrations were determined by the BCA method (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, USA). Afterwards, the derivatization of protein carbonyls with DNPH solution and subsequent detection using the Oxyblot™ protein oxidation detection kit was performed. Assays were carried out in duplicate, using two amounts of proteins: 15.5 and 6.5 µg. The protein was derivatized and separated on SDS polyacrylamide. Following separation, the gels were transferred to a PVDF membrane, probed with the primary and secondary antibodies provided in the kit and developed using enhanced chemiluminescence (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham™ Buckinghamshire, UK). Membrane was stripped and reprobed using Actin (H-300):sc-10731 antibody (Santa Cruz Biotechnology, inc., CA, USA).

2.12. Statistical analysis

The data of the lifespan assays were processed using the Kaplan-Meier survival analysis using the PC software package SPSS (version 13.0; SPSS Inc., Chicago). The *p* values were calculated by Kaplan-Meier *long-rank* pair-wise comparison between the control and the treated flavonol groups. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences were assessed with an LSD test (*p* < 0.05).

3. Results

3.1. Preliminary assays

Prior to the studies with *C. elegans*, the stability of the assayed compounds in the culture media was checked. With this aim, NGM media containing each of the flavonols were prepared, distributed in plates and kept at 20 °C for 30 days. The compounds extracted from the plates with methanol: water (80 : 20, v/v) were analysed every 5 days by HPLC-DAD-ESI/MS. The results obtained showed that the compounds remained stable in the media during the assayed period, and that no

significant decrease in their concentrations was produced (neither products of their possible degradation were formed).

3.2. Effects of isorhamnetin, tamarixetin and quercetin on *C. elegans*

A. Phenotypic characteristics. The treatment with tamarixetin or isorhamnetin (200 μ M) did not lead to significant differences ($p < 0.05$) in the body length of nematodes measured at the 6th day of adulthood with respect to controls (untreated animals). A slight reduction of the worm's size of approximately 4% was observed in the worms exposed to tamarixetin although it was found not to be significant. However, treatment with quercetin significantly enlarged the body size by around 11% (Fig. 2A).

Exposure to quercetin (200 μ M) slightly but significantly increased ($p < 0.05$) the reproductive capacity of *C. elegans* (9%) with respect to the controls, whereas no significant differences in total reproduction output were induced by isorhamnetin and tamarixetin compared to the untreated worms (Fig. 2B). In all cases the reproduction started on the first day of adulthood and was completed on the 4th day.

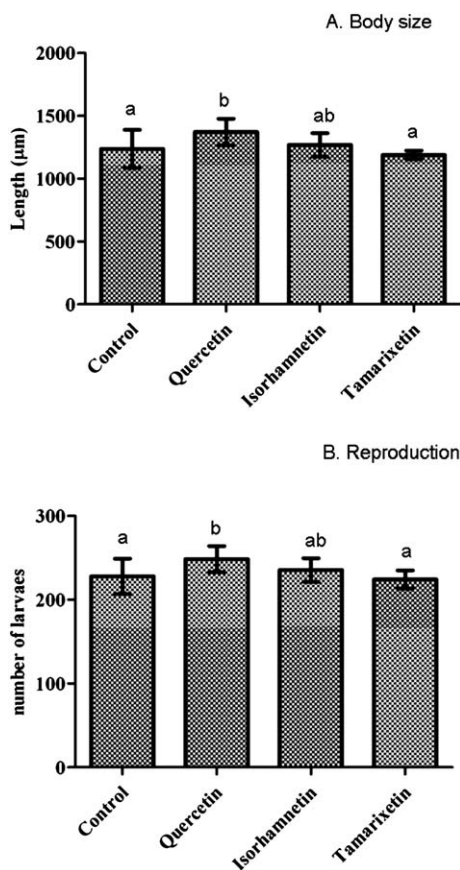


Fig. 2 Influence of isorhamnetin, tamarixetin and quercetin on nematode length (A), and reproduction (B). Results were evaluated at the 6th day of worm adulthood. Assays were performed at a concentration of 200 μ M of the assayed flavonols in the culture media. The error bars represent standard deviation ($n = 20$). Different letters indicate the existence of significant differences ($p < 0.05$).

In order to check if this effect on reproduction may be due to an interference of the estrogenic metabolism, the influence of the studied flavonols on the expression of LET-767, an enzyme that shares the highest homology with human 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenases (types 3 and 12), was explored. It has been shown that mutations that inactivate LET-767 affect growth, reproduction and development in *C. elegans*.⁴⁰ Quantification of mRNA of LET-767 enzyme by real time PCR was performed using three internal controls (*act-1*, *ama-1* and *18s*). The obtained results suggested that quercetin and isorhamnetin could significantly up-regulate the expression of the estrogenic metabolism gene *let-767* with respect to worms without treatment when *act-1* was used as internal control. However, no relevant differences in the expression of gene *let-767* with respect to the untreated worms were observed when the other two internal controls (*ama-1* and *18s*) were used.

B. Thermal stress resistance. Fig. 3 shows the rates of survival of worms exposed to thermal stress (35 $^{\circ}$ C, 8 h) in the 1st day (young adults) and 6th day of adulthood, after pre-treatment with quercetin or its methylated derivatives (200 μ M). In all cases previous exposure to the flavonols significantly increased the thermoresistance of *C. elegans* compared to untreated animals.

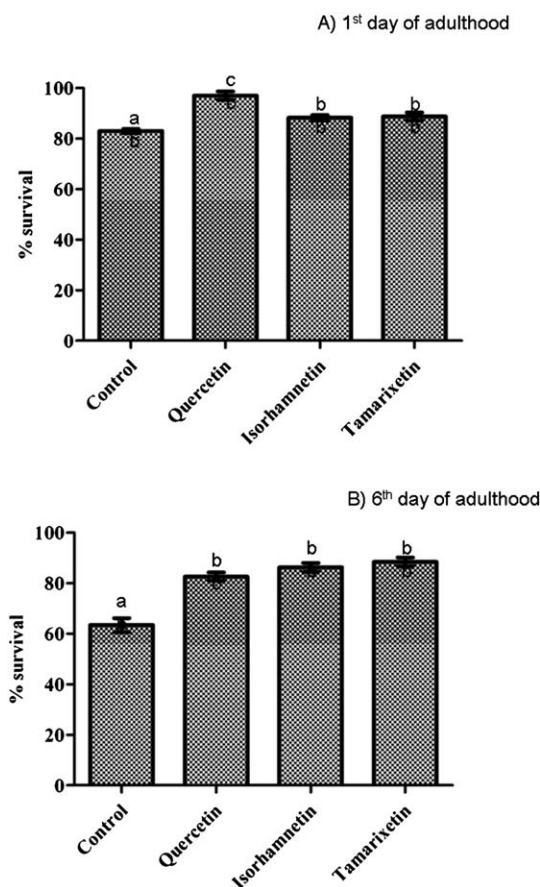


Fig. 3 Resistance against thermal stress after pre-treatment with isorhamnetin, tamarixetin or quercetin (200 μ M). Results obtained at the 1st day (A), and 6th day of worm adulthood (B). The error bars represent standard deviation ($n = 20$). Different letters indicate the existence of significant differences ($p < 0.05$).

The enhancement in the survival rate produced by quercetin (+17%) was significantly greater than the one induced by its methylated derivatives (+5–7%) when the stress was applied at the 1st day of adulthood (Fig. 3A). The increase in the survival rates was higher in the worms thermally stressed at the 6th day of adulthood (Fig. 3B), being the greatest effect observed for tamarixetin (+39% increase in the survival percentages in relation to the control), although differences among the three studied compounds were not significant ($p < 0.05$).

C. Oxidative stress resistance. The efficiency of the pre-treatment with the assayed flavonols (200 μ M) to prevent oxidative stress induced by juglone (150 μ M, 24 h), a pro-oxidant able to convert oxygen to the superoxide radical anion,³⁷ was also checked. As it can be observed in Fig. 4A, the rates of survival significantly increased in the flavonol-pretreated worms when they were exposed to juglone in the 1st day of adulthood compared to the controls. A significantly greater protection was provided by quercetin (increase of around 12% in the survival rate) than by its methylated derivatives (+9 to 10%). An increase in the survival percentages was also found in the worms treated with quercetin or isorhamnetin (around +15% in both cases), but

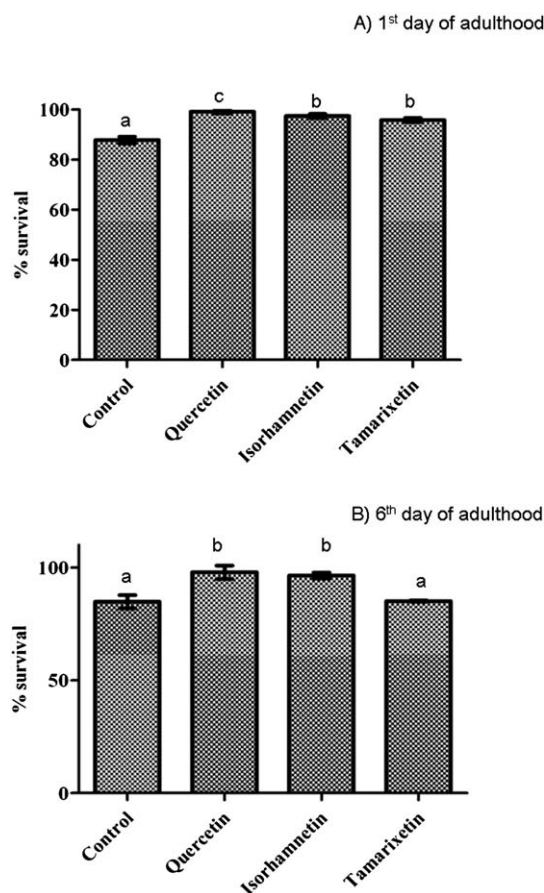


Fig. 4 Resistance against juglone-induced oxidative stress after pre-treatment with isorhamnetin, tamarixetin or quercetin (200 μ M). Results obtained at the 1st day (A), and 6th day of worm adulthood (B). The error bars represent standard deviation ($n = 20$). Different letters indicate the existence of significant differences ($p < 0.05$).

not in the case of tamarixetin when the oxidative stress was induced in the 6th of day of adulthood (Fig. 4B).

To verify the oxidation status of proteins in *C. elegans* treated with the different flavonols and controls, an assay using the commercial OxyBlot™ kit was performed. Negative controls for each of the samples were used (proteins that have not been derivatized). Fig. 5 shows that the worms treated with flavonols presented a marked decrease in the oxidation of proteins with respect to untreated animals. Lower density was found in the bands of the worms treated with quercetin, suggesting that it provided greater protection against protein oxidation in the worms than its methylated metabolites.

D. Lifespan. Fig. 6 shows the curves of survival of wild-type *C. elegans* grown at 20 °C in media containing isorhamnetin, tamarixetin or quercetin compared with untreated worms. In the first stage (during the reproductive period) greater rate of worm death was observed in the assays containing the studied compounds than in the control. However, in further stages of worm development a significant increase in the lifespan of *C. elegans* was produced in the presence of the compounds. The results shown in Table 1 revealed that the greatest effect was provided by isorhamnetin with an increase of 16% in lifespan with respect to the control (18.2 days vs. 10.5 days), whereas quercetin and tamarixetin increased it by 11%. Isorhamnetin also provided the maximum lifespan calculated as the mean of the longest living 10% of each population (increase of 16% with respect to the control). The *long-rank* test revealed the different treatments with flavonols were significantly different with respect to the controls ($p < 0.05$).

3.3. Uptake of quercetin, isorhamnetin and tamarixetin by *C. elegans*

The uptake of the studied flavonols by *C. elegans* was assayed in media containing either live or dead *E. coli* OP50 as a food source for the worms. After 4–6 days of incubation at –20 °C, the worms were collected and homogenised in methanol as described in the experimental section, and the obtained extracts analysed by HPLC-DAD-ESI/MS. In all cases the presence of assayed flavonols and some related metabolites was observed in the chromatograms (Fig. 7), confirming the incorporation of the

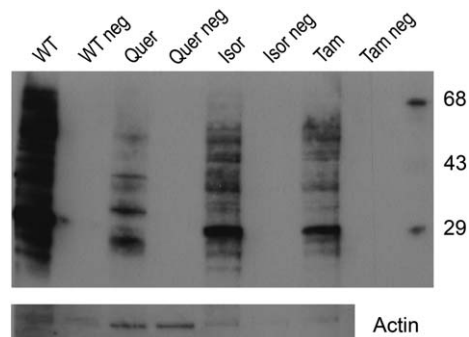


Fig. 5 Influence of quercetin, isorhamnetin and tamarixetin in the protein oxidation evaluated by the OxyBlot™ kit. Non-derivatized proteins were used as negative controls for each sample. Membrane was re-probed with actin antibody to allow loading variation.

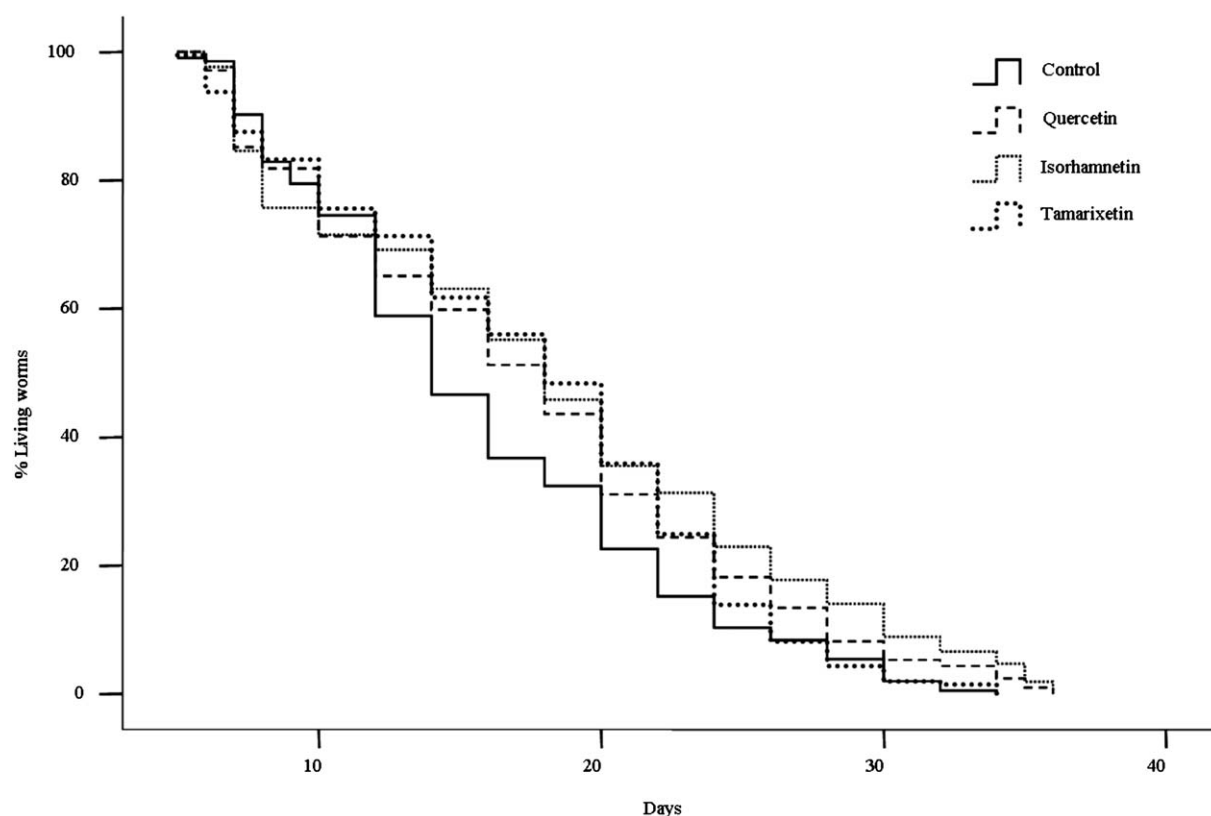


Fig. 6 Rates of *C. elegans* survival obtained in culture media containing 200 μM of isorhamnetin, tamarixetin or quercetin, compared to a control of untreated worms.

compounds by the worm. Identical results were obtained in the assays performed with live and dead bacteria, confirming that the latter were not influencing the uptake of the flavonols by the nematodes and that the metabolites observed resulted from biotransformation by *C. elegans* and not by the bacteria.

Table 2 shows the results of the HPLC-DAD-ESI/MS analyses in the assays with the different flavonols and the tentative identification of the metabolites detected. None of the metabolites was observed in the control assays (worms grown in media containing 0.2% DMSO without flavonols), which confirmed that they actually derived from transformation of the assayed flavonols.

In the assays carried out with quercetin (chromatogram in Fig. 7A) eight peaks corresponding to quercetin-related metabolites were unequivocally detected. Peaks 1, 2 and 4 showed λ_{max} at 354 nm and a precursor ion at m/z 463, releasing one fragment ion at m/z 301 (quercetin) by loss of a hexose moiety

(-162 amu), indicating that they were quercetin glycosides. Only peak 1 could be fully identified as quercetin 3-*O*-glucoside by comparison of its retention, UV and mass spectral characteristics with our data library and a commercial standard. Peaks 6, 7 and 8 showed a precursor ion at m/z 543, and a daughter ion at m/z 301 (quercetin), suggesting the loss of one hexose (-162 amu) and one sulfate (-80 amu) moieties. This was confirmed by analysis in enhanced product ion (EPI) mode, where the parent ion (m/z at 543) yielded two fragments at m/z 381 ([M-H-162] $^-$) and at m/z 301 ([M-H-162-80] $^-$). Thus, these compounds were assigned as quercetin sulfate-glycosides. The successive losses of the sugar and sulfate moieties suggest that they were located at different positions on the quercetin, although the precise position of substitution could not be concluded. Peaks 8 and 9 corresponded to quercetin and isorhamnetin, respectively. The formation of this latter also suggests the existence of methyltransferase activity by the nematode.

Table 1 Influence of quercetin, isorhamnetin and tamarixetin (200 mM) on adult lifespan of *C. elegans* under normal growth conditions at 20 $^{\circ}\text{C}^b$

Treatment	Mean (days)	Median (days)	Maximum (days) ^a	<i>n</i>	<i>p</i> vs. control
Control	15.7 \pm 0.5	14.0 \pm 0.6	29.3 \pm 1.0	304	
Quercetin	17.4 \pm 0.5	18.0 \pm 0.8	30.8 \pm 2.0	309	0.008
Isorhamnetin	18.2 \pm 0.6	18.0 \pm 0.7	34.0 \pm 0.6	314	0.000
Tamarixetin	17.5 \pm 0.5	18.0 \pm 0.7	28.7 \pm 0.5	309	0.018

^a Maximum lifespan was determined as the mean life span of the longest living 10% of each population. ^b Mean \pm standard deviation ($n = 3$). Statistical significance was calculated by long-rank testing, changes in mean lifespan are considered significant at $p < 0.05$.

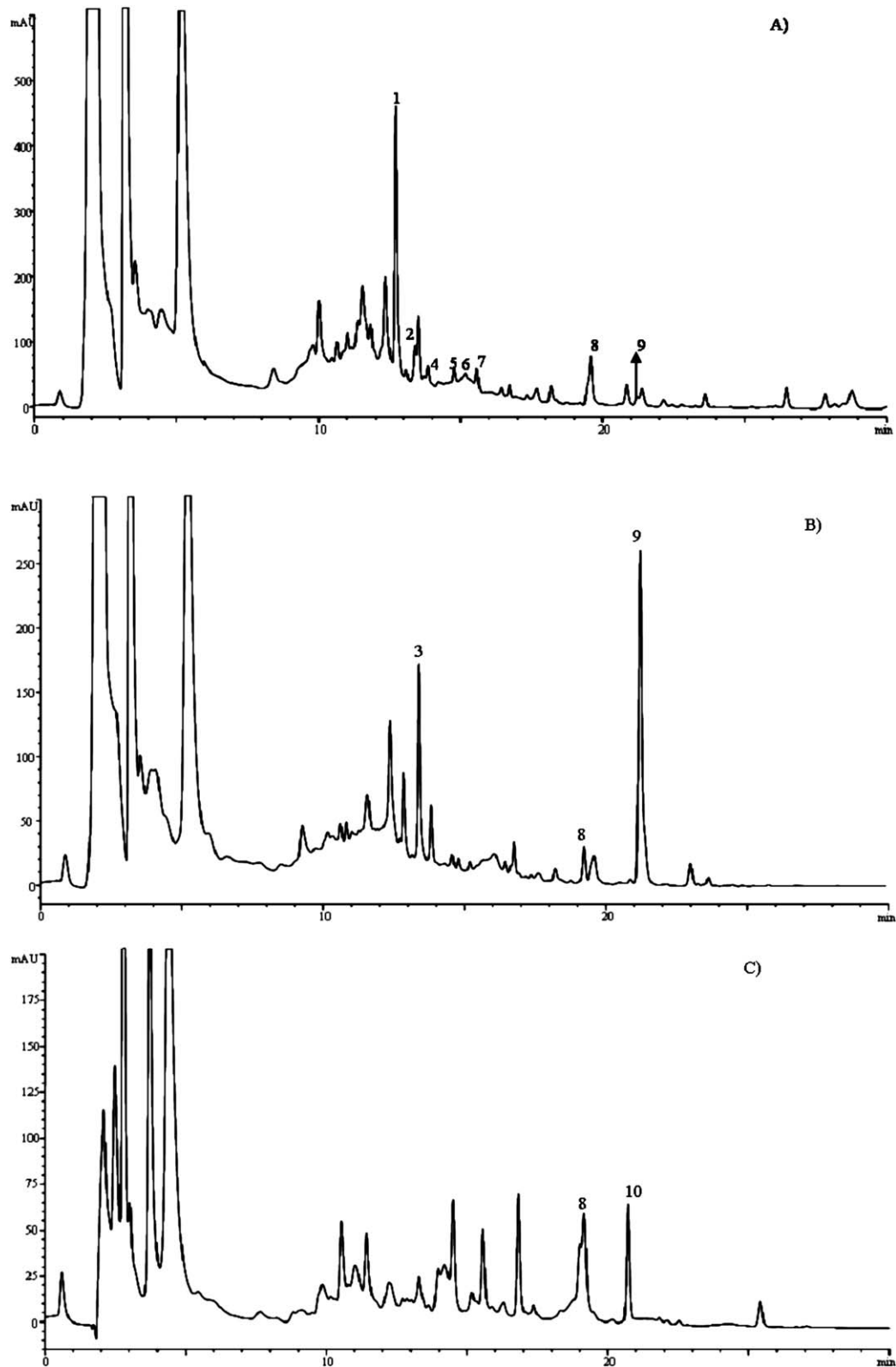


Fig. 7 HPLC chromatograms recorded at 370 nm of extracts of *C. elegans* obtained after incubation of the worms for 5 days in culture media containing quercetin (A), isorhamnetin (B) or tamarixetin (C). Peaks identified as metabolites of the assayed flavonols are marked with numbers. See Table 2 for peak identities.

In the assays carried out with isorhamnetin and tamarixetin, their presence was also detected in the chromatograms (Fig. 7B and 7C and Table 2), confirming their uptake by the nematode. In both cases, quercetin was also detected in the chromatograms, indicating a demethylating activity by *C. elegans*. Furthermore, the presence of some glycosyl and sulfate-glycosyl derivatives of these flavonols was also found (see Table 2), confirming that they are metabolized following similar biotransformation pathways as quercetin.

Peak 3, detected in the assays with isorhamnetin, showed a UV spectrum with λ_{\max} at 355 nm, similar to quercetin 3-*O*-glucoside, but eluted at a different retention time. This compound showed a precursor ion at *m/z* 625, and daughter ion at *m/z* 301, corresponding to loss of two hexoses moieties ($M-H-162-162$)[−] which allowed its tentative identification as a quercetin diglycoside.

In order to compare of the uptake of the different assayed flavonols by *C. elegans*, they were quantified from their chromatographic peaks and expressed as μg of compound per mg worm protein. More prominent metabolites were also quantified and expressed as quercetin equivalents. The obtained results are shown in Table 3. Although the quantified concentration of quercetin ($19.85 \mu\text{g mg}^{-1}$ protein) was much lower than those of isorhamnetin and tamarixetin (48.80 and $49.85 \mu\text{g mg}^{-1}$ protein, respectively), the sum of the concentrations of quercetin plus its quantifiable metabolites ($89.60 \mu\text{g mg}^{-1}$ protein) was higher than those of isorhamnetin or tamarixetin plus their metabolites (56.95 or $52.95 \mu\text{g mg}^{-1}$ protein). These results suggested that greater uptake of quercetin than its methylated derivatives by the nematode exists. As far as we know, the only estimation of the uptake of quercetin by *C. elegans* was made by Kampkötter *et al.*,¹⁶ although their results cannot be compared with ours, as the assays were carried out in liquid medium and expressed as nmol quercetin per 1000 worm instead of per protein. No quercetin metabolites were analysed in that study.

4. Discussion

Quercetin significantly increased reproductive capacity of *C. elegans* and enlarged the body size, whereas no modification of these characteristics was induced by their methylated derivatives, isorhamnetin and tamarixetin.

In a study carried out by Kampkötter *et al.*¹³ with a *Ginkgo biloba* extract containing tamarixetin as a component, no effects

on the reproduction of *C. elegans* were found, although the worm's body size decreased approximately 17%, which might agree with the slight (not significant) reduction in the worm length observed in our assays with tamarixetin. This effect could be a symptom of caloric restriction mechanisms and/or explained by the possible interaction of the compound with signalling processes that influence the worm's body size.¹⁷ Contrary to our observations, no differences in the reproductive output or body length of the nematodes exposed to 100 and 200 μM of quercetin were found by Pietsch *et al.*¹⁸ This discrepancy with our results might be explained because the assays of those authors were performed with nematodes of the F1 generation whose parents had been exposed to quercetin.

Quantification of mRNA of *let-767* gene was performed by real time PCR in order to determine if the effects of quercetin and its methylated metabolites on the increase of the reproductive capacity of the worms may be related to estrogenic metabolism. As above indicated, whereas quercetin and isorhamnetin appeared to up-regulate the expression of the estrogenic metabolism gene *let-767* in the worms in the assays using *act-1* as an internal control, no clear differences in the expression of this gene with respect to untreated animals were observed in the assays performed using the other two controls (*ama-1* and *18s*). This discrepancy did not allow us to conclude that differences in the expression of *let-767* gene were responsible for the increase in the reproductive capacity of worms. Further studies are thus required to verify the mechanisms involved in the apparent increase of fertility in the worms treated with flavonols.

All the assayed flavonols significantly prolonged the lifespan of *C. elegans* with an increase from 11% to 16% in mean lifespan with respect to controls (17.5 to 18.2 days vs. 15.7 days), being the treatment with isorhamnetin the most effective. Wu *et al.*¹⁰ observed that tamarixetin prolonged the median lifespan of *C. elegans* by 25%, whereas kaempferol, quercetin or *G. biloba* extracts did not increase significantly the life of the nematode with respect to controls. An increase of 19% in the duration of *C. elegans* life was, however, observed by Kampkötter *et al.*,¹⁶ although this result can not be fully compared with ours, since their studies were performed in liquid medium.

Exposure to the three assayed flavonols also significantly increased the resistance of the worms to thermal stress, although differences were found depending on the stage of development. Thus, quercetin offered greater protection (+17% increase in the

Table 2 Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption (λ_{\max}), mass spectral data, and tentative identification of metabolites detected in the assays carried out in the presence of quercetin (Q), isorhamnetin (Is) or tamarixetin (Tm)

Peak	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Fragment ions (<i>m/z</i>)	Tentative identification	Assay
1	12.7	355.2	463	301	Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside ^a	Q
2	13.2	355.0	463	301	Quercetin glycoside	Q
3	13.3	354.0	625	301	Quercetin diglycoside	Is
4	13.8	355.0	463	301	Quercetin glycoside	Q
5	14.7	342.0	543	381,301	Quercetin sulfate glycoside	Q
6	15.1	—	543	381,301	Quercetin sulfate glycoside	Q
7	15.5	346.8	543	381,301	Quercetin sulfate glycoside	Q
8	19.5	372.0	301	—	Quercetin ^a	Q, Is, Tm
9	21.2	370.0	315	301	Isorhamnetin ^a	Q, Is
10	21.4	370.0	315	301	Tamarixetin ^a	Tm

^a The identity of these compounds was confirmed by comparison of their chromatographic, spectral and MS characteristics with those of real standards.

Table 3 Concentrations ($\mu\text{g mg}^{-1}$ protein) of the studied flavonols and their quantifiable metabolites determined in *C. elegans* cultivated in the presence of quercetin, isorhamnetin or tamarixetin (200 μM)^a

Concentration ($\mu\text{g mg}^{-1}$ protein)	Assay		
	Quercetin	Isorhamnetin	Tamarixetin
Quercetin	19.85 ± 2.05^c	1.95 ± 0.35	3.10 ± 0.42
Isorhamnetin	15.95 ± 2.47	48.80 ± 5.83	nd
Tamarixetin	nd	nd	49.85 ± 1.20
Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside ^b	33.90 ± 2.83	—	—
Other quercetin glycosides ^b	19.90 ± 2.55	—	—
Quercetin diglycoside ^b	—	6.20 ± 1.55	—
Total	89.60	56.95	52.95

^a nd: not detected. ^b Expressed as quercetin equivalents. ^c Mean \pm standard deviation ($n = 3$).

survival percentages in relation to controls) when thermal stress was applied in the 1st day of adulthood, whereas tamarixetin (+39%) was more efficient in worms submitted to stress in the 6th day of adulthood. The different results obtained at the two stages of development may be explained as due to worm ageing, since stress resistance and life expectancy are generally linked.¹⁰ Some studies have been published showing an improvement in thermal resistance of *C. elegans* by different flavonols such as quercetin, kaempferol, fisetin, and quercetin-3-*O*-rutinoside,^{14,15} as well as by *Ginkgo biloba*¹³ and blueberry flavonoid-rich extracts.¹¹ It was reported that these compounds reduced the intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation produced by thermal stress, which is likely to be at least partially involved in the death of the worms.^{13,15} According to our knowledge, no previous studies have been published dealing with the influence of methylated forms of quercetin in thermal resistance of *C. elegans*, neither the effects at two stage of development have been checked.

The assayed compounds also proved efficient to protect the nematode against juglone-induced oxidative stress. A significantly greater protection was provided by quercetin (increase of around 12% in the survival rate compared to controls) than by its methylated derivatives (+9–10%) at the 1st day of adulthood, whilst quercetin and isorhamnetin were equally efficient (around +15% of survival in both cases), but not in tamarixetin (no significant improvement in relation to the controls), when the oxidative stress was induced in the 6th of day of adulthood. These results are consistent with the previously observed quercetin-mediated increase in oxidative stress resistance of *C. elegans* in studies carried out in liquid medium.¹⁶ Similar observations were also made in assays performed with a *Ginkgo biloba* extract containing quercetin and tamarixetin.¹⁰ Other flavonols such as kaempferol and fisetin were also showed to diminish the extent of oxidative stress in oxidatively challenged worms.¹⁵

In order to confirm the existence of an antioxidant protective effect, an OxyBlot analysis was performed to check the oxidation status of proteins in the worms treated with the different flavonols and controls. Carbonyl groups introduced into protein side chains during oxidative modification by ROS and other reactive species are a hallmark of the oxidation status of proteins, and can be analysed by immunodetection using the OxyBlotTM reaction Kit. The results obtained (Fig. 5) confirmed that the exposure to flavonols induced a marked decreased in the oxidation of proteins, which would confirm the antioxidant effect of the studied compounds, particularly higher in the case of quercetin,

The protective effects against thermal and oxidative stress provided by flavonoids have been suggested to be due to their ability to decrease intracellular ROS accumulation together with a parallel down-regulation of catalases.^{11,13,41} In previous *in vitro* studies carried out by our group³⁰ it was also found that quercetin and its methylated derivatives behave as better radical scavengers and reducing compounds than usually recognised antioxidants like α -tocopherol. Indeed, flavonoids are widely recognised as antioxidant compounds, although they are also able to act as pro-oxidants in *in vivo* situations.⁴² Whereas pro-antioxidant activity is expected to produce toxic effects, in practice light pro-oxidant effects might also be beneficial, since by imposing a mild degree of oxidative stress, the levels of antioxidant defences and xenobiotic-metabolising enzymes might be raised, leading to overall cytoprotection.^{42,43}

The concentrations of flavonols used in the culture media in our study (200 μM) are certainly high when compared with the levels of these compounds that might be found in human plasma and tissues (in the nanomolar to low micromolar range).^{44,45} However, we do not know the actual extent in which the assayed compounds are incorporated by the worm, which could be quite low and insufficient to cause toxic pro-oxidant effects but rather induce beneficial responses. The mechanisms of the protective effects observed in our studies remain, thus, to be established. Further studies are required to assess the bioavailability of the assayed flavanols in the worm model, as well as to conclude about the cellular and molecular mechanisms involved in observed effects.

With the aim to have a first approach to the bioavailability of flavonols in *C. elegans*, assays to evaluate their uptake by the worm were also performed. It could be demonstrated that the three studied flavonols were incorporated by the nematode and partially biotransformed to different Phase II conjugated metabolites (*i.e.*, glycosylated and sulfated forms), some of which could be tentatively identified. The existence of glucosyl-transferase and sulfotransferase enzymatic activities were described in the worm,^{46,47} which would explain the formation of these metabolites. In *C. elegans*, the glycosylation machinery is similar to that in mammals in that nematodes express glucosyl-transferase enzymes involved in both *N*-linked and *O*-linked glycosylation pathways. The *C. elegans* genome contains a total of nine genes that express thirteen glycosyltransferase mRNAs, all of which share significant sequence similarity and predicted structural topology with mammalian ppGaNtases.⁴⁸ Sulfation is

catalyzed by the members of the cytosolic sulfotransferase (SULT) enzyme family, which in mammals have been classified into six families. *C. elegans* has only one SULT homologue in its genome, in contrast to the human genome that contains 17 SULT genes. Hattori *et al.*⁴⁹ identified a gene (clone Y113G7A.11) from *C. elegans*, designed as ceST1 gene that was annotated in WormBase as a cytosolic sulfotransferase, and that was, in fact, the only such SULT homologue in the *C. elegans* genome. According to Hattori *et al.*⁴⁹ this sulfotransferase either forms part of the defence system against xenobiotics or regulates germ cell proliferation in *C. elegans*.

The sugar(s) used by the nematode for flavonol conjugation may derive from the hydrolysis of the polysaccharides present in the agar medium, and similarly the sulfate residues could derive from either the potassium sulfate added to the culture medium or the agar that contains sulfated polysaccharides. The identification of isorhamnetin in the assays carried out with quercetin also suggests a methyltransferase activity in the nematode, and the appearance of quercetin in the assays with isorhamnetin and tamarixetin, a demethylating activity.

Quantification of the studied flavonols and their majority metabolites revealed that higher levels of quercetin plus metabolites were present in the worms in worm's organism than those of isorhamnetin or tamarixetin plus their respective metabolites. This observation suggested that greater capacity of uptake of quercetin than of the methylated derivatives by the nematode exists, although quercetin is further biotransformed by *C. elegans* in a greater extent than isorhamnetin or tamarixetin.

5. Conclusions

The results obtained in this study demonstrated that quercetin, isorhamnetin and tamarixetin increase the resistance of *C. elegans* against thermal and oxidative stress and are also able to prolong the lifespan of the worm. The results also suggested that lifespan extension might be associated with the increased reproductive capacity of nematode. Although further studies are required in order to verify the mechanism involved in this effect. Analyses by HPLC-DAD-ESI/MS confirmed the uptake of the three studied compounds by the nematode and their biotransformation to different glycosylated, sulfated and methylated metabolites. Quantification of levels of the flavonols and their main metabolites suggested an increased bioavailability of quercetin in the nematode compared to its methylated derivatives.

Acknowledgements

Financial support was obtained from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación* through the projects AGL2009-12001 and CSD2007-00063 (Fun-c-Food, Consolider-Ingenio 2010 Programme). Dr J. Cabello was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant BFU2010-21794) and the Rioja-salud Foundation. Dr M. Dueñas also thanks the Spanish "Ramón y Cajal" Program for a contract.

References

- G. Block, *Nutr. Rev.*, 1992, **50**, 207–213.
- M. G. L. Hertog, E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman and M. B. Katan, *Lancet*, 1993, **342**, 1007–1011.
- P. Knekt, R. Jarvinen, A. Reunanen and J. Maatela, *Br. Med. J.*, 1996, **312**, 478–481.
- L. Yochum, L. H. Kushi, K. Meyer and A. R. Folsom, *Am. J. Epidemiol.*, 1999, **149**, 943–949.
- C. A. Rice-Evans, N. J. Miller and G. Paganga, *Free Radical Biol. Med.*, 1996, **20**, 933–956.
- N. C. Cook and S. Samman, *J. Nutr. Biochem.*, 1996, **96**, 66–76.
- P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J. P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A. J. Vlietinck and D. Vanden Berghe, *J. Nat. Prod.*, 1998, **61**, 71–76.
- E. L. da Silva, T. Tsushida and J. Terao, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **349**, 313–320.
- G. Williamson and C. Manach, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, **81**, 243S–255S.
- Z. Wu, J. V. Smith, V. Paramasivam, P. Butko, I. Khan, J. R. Cypser and Y. Luo, *Cell Mol. Biol.*, 2002, **48**, 725–731.
- M. A. Wilson, B. Shukitt-Hale, W. Kalt, D. K. Ingram, J. A. Joseph and C. A. Wolkow, *Aging Cell*, 2006, **5**, 59–68.
- M. K. Brown, J. L. Evans and Y. Luo, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2006, **85**, 620–628.
- A. Kaempkötter, T. Pielarski, R. Rohring, C. Timpel, Y. Chovolou, W. Watjen and R. Kahl, *Pharmacol. Res.*, 2007, **55**, 139–147.
- A. Kaempkötter, C. Gombitang-Nkwonkam, R. F. Zurawski, C. Timpel, Y. Chovolou, W. Watjen and R. Kahl, *Toxicology*, 2007, **234**, 113–123.
- A. Kaempkötter, C. Gombitang-Nkwonkam, R. F. Zurawski, C. Timpel, Y. Chovolou, W. Watjen and R. Kahl, *Arch. Toxicol.*, 2007, **81**, 849–858.
- A. Kaempkötter, C. Timpel, R. F. Zurawski, S. Ruhl, Y. Chovolou, P. Proksch and W. Watjen, *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 2008, **149**, 314–323.
- N. Saul, K. Pietsch, R. Menzel, S. R. Stürzenbaum and C. E. W. Steinberg, *Mech. Ageing Dev.*, 2008, **129**, 611–613.
- K. Pietsh, N. Saul, R. Menzel, S. R. Stürzenbaum and C. E. W. Steinberg, *Biogerontology*, 2009, **10**, 565–578.
- L. Zhang, G. Jie, J. Zhang and B. Zhao, *Free Radical Biol. Med.*, 2009, **46**, 414–421.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium, *Science*, 1998, **282**, 2012–2018.
- T. Kaletta and M. O. Hengartner, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2006, **5**, 387–399.
- A. Strayer, Z. Wu, Y. Christen, C. D. Link and Y. Luo, *FASEB J.*, 2003, **17**, 2305–2307.
- Z. Cao, Y. Wu, K. Curry, Z. Wu, Y. Christen and Y. Luo, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2007, **62**, 1337–1345.
- D. Garigan, A. L. Hsu, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer and C. Kenyon, *Genetics*, 2002, **161**, 1101–1112.
- B. Gerstbrein, G. Stamatas, N. Kollias and M. Driscoll, *Aging Cell*, 2005, **4**, 127–137.
- J. P. Spencer, G. Chowrimootoo, R. Choudhury, E. S. Debnam, S. K. Srai and C. Rice-Evans, *FEBS Lett.*, 1999, **458**, 224–230.
- A. J. Day, Y. Bao, M. R. A. Morgan and G. Williamson, *Free Radical Biol. Med.*, 2000, **29**, 1234–1243.
- I. Vastrik, P. D'Eustachio, E. Schmidt, G. Joshi-Tope, G. Gopinath, D. Croft, B. de Bono, M. Gillespie, B. Jassal, S. Lewis, L. Matthews, G. M. Wu, E. Birney and L. Stein, *Genome Biology*, 2007, **8**, R39.
- S. J. Lee, T. M. Coleen and C. Kenyon, *Cell Metab.*, 2009, **10**, 379–391.
- J. S. Griffiths, D. L. Huffman, J. L. Whitacre, B. C. Barrows, L. D. Marroquin, R. Muller, J. R. Brown, T. Hennen, J. D. Esko and R. V. Aroian, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 45594–45602.
- S. J. McKay, R. Johnsen, J. Khattra, J. Asano, D. L. Baillie, S. Chan, N. Dube, L. Fang, B. Goszczynski, E. Ha, E. Halfnight, R. Hollebakk, P. Huang, K. Hung, V. Jensen, S. J. M. Jones, H. Kai, D. Li, A. Mah, M. Marra, J. McGhee, R. Newbury, R. Pouzyrev, D. L. Riddle, E. Sonnhammer, H. Tian, D. Tu, J. R. Tyson, G. Vatcher, A. Warner, K. Wong, Z. Zhao and D. G. Moerman, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 2004, **68**, 159–169.
- D. L. Crawford, R. O. Sinnhuber and H. Aft, *J. Food Sci.*, 1960, **26**, 139–145.
- K. Lemanska, H. Van der Woude, H. Szymusiak, M. B. Boersma, A. Gliszczynska-Swiglo, I. M. C. M. Rietjens and B. Tyrakowska, *Free Radical Res.*, 2004, **38**, 639–647.

- 34 M. Dueñas, S. Gonzalez-Manzano, A. M. Gonzalez-Paramas and C. Santos-Buelga, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, **51**, 443–449.
- 35 S. Brenner, *Genetics*, 1974, **77**, 71–94.
- 36 J. Gruber, S. Y. Tang and B. Halliwell, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007, **1100**, 530–542.
- 37 E. de Castro, S. H. de Castro and T. E. Johnson, *Free Radical Biol. Med.*, 2004, **37**, 139–145.
- 38 B. J. Reinhart and G. Ruvkun, *Genetics*, 2001, **157**, 199–209.
- 39 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.
- 40 S. Desnoyers, P. G. Blanchard, J. F. St-Laurent, S. N. Gagnon, D. L. Baillie and V. Luu-The, *J. Endocrinol.*, 2007, **195**, 271–279.
- 41 J. V. Smith and Y. Luo, *J. Alzheimers Dis.*, 2003, **5**, 287–300.
- 42 B. Halliwell, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, **476**, 107–112.
- 43 S. Y. Tang and B. Halliwell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **394**, 1–5.
- 44 J. P. E. Spencer, M. M. A. El Mohsen, A. M. Minihane and J. C. Mathers, *Brit. J. Nutr.*, 2008, **99**, 12–22.
- 45 W. M. Loke, A. M. Jenner, J. M. Proudfoot, A. J. McKinley, J. M. Hodgson, B. Halliwell and K. D. Croft, *J. Nutr.*, 2009, **139**, 2309–2314.
- 46 T. Sherman, M. N. Chernova, J. S. Clark, L. Jiang, S. L. Alper and K. Nerke, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.*, 2005, **289**, C341–351.
- 47 P. M. Berninsone, in *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2006, doi/10.1895/wormbook.1.125.1, <http://www.wormbook.org>.
- 48 F. Hagen, M. Layden, K. Nehrke, K. Gentile, K. Berbach, C. C. Tsao and M. Forsythe, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2001, **13**, 463–479.
- 49 K. Hattori, M. Inoue, T. Innoue, H. Arai and H. Tamura, *J. Biochem.*, 2006, **139**, 355–362.